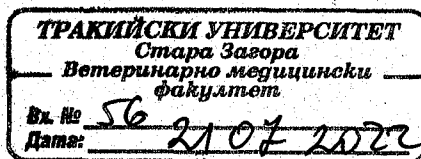


РЕЦЕНЗИЯ



върху дисертационен труд 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“.

Тема на дисертационния труд: *„Прицелни мишени на биоактивни добавки с фитогенни компоненти в репродуктивната система“* с автор доц. д-р Елена Кузминична Кистанова.

Рецензент: проф. дн Апостол Петров Апостолов, Земеделски институт – Шумен / заповед № 1850/ 15.06.2022г. на основание чл. 4 (3), (4) от ЗРАСБР, чл. 5 (3), (4) от ПРАСТрУ и решение на ФС на ВМФ, протокол № 28/14.06.2022г.

I. Справка за кариерното развитие

Доц. д-р Елена Кузминична Кистанова е завършила висше образование през 1980г. в Пензенски държавен педагогически институт, Русия. Придобива образователна и научна степен „Кандидат на биологическите науки“ през 1985г., утвърдена от ПВАК № 1949 от 13.05.1993г. Провежда изследвания по репродукция на селскостопанските животни от 1989г. и до сега последователно в ИЖН – Костинброд и ИБИР към БАН.

През 2009г. придобива академична длъжност „Доцент“ по научна специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“ шифър 04.02.01.

Заемала е ръководни длъжности като ръководител на отдел по международно сътрудничество, а през 2011-2014г. е била заместник директор на ИБИР.

Общата и публикационна активност включва над 110 публикации (от които 12бр. свързани с дисертацията) и 70 резюмета с повече от 200 цитирания. Участвала е в повече от 20 проекта (от които 6бр. по дисертацията) с международно финансиране и такива финансирани от МОН, от които отличавам участието и като експерт в проект по VII - Рамкова програма „РеПроФорсе“.

Представеният автореферат съдържа достатъчно информация за използваните методи, резултатите, произтичащите от тях изводи и може да бъде даден за печат.

Цялостната изследователска дейност и кариерното развитие, характеризират доц. д-р Елена Кузминична Кистанова като изтъкнат учен и високо квалифициран специалист в областта на репродукцията на селскостопанските животни.

II. Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 216 страници и библиография съдържаща 447 литературни източници, от които 442бр. на латиница. Дисертацията е илюстрирана с 43 фигури в т.ч. множество схеми и снимков материал, както и 39 таблици.

Трудът съдържа възприетите раздели, които могат да бъдат описани както следва: увод и литературен преглед – 43стр., цел, материал и методи – 20стр. резултати и обсъждане – 63стр., насоки и перспективи за изпитване на натурални биодобавки, изводи и препоръки – 6стр. Така анализираният обем и структура на дисертационния труд ми дават основание да твърдя, че същите покриват необходимите изисквания и критерии за неговото изготвяне.

III. Актуалност на проблема

Прилагането на нови стратегии и инструменти в организацията и управлението на развъдния процес доведе до съществени промени в репродуктивните способности на индивидите. Естралният цикъл на женските животни и сексуалната активност на мъжките се контролират от гонадотропните хормони (FSH-фоликулостимулиращ хормон и LH-лутейнизиращ хормон), които от своя страна определят нивата на стероидните хормони. Установено е, че същите се характеризират със средна до висока наследяемост (андростенон и феромоните – $h^2 = 0,55$).

Голяма част от генетичното вариране по отношение на овулацията, броя на ембрионите и родените бозайници се определя от действието на гените на майката с изключение на плодовитостта, където и за двата пола херетабилитета е в ниски граници. Високият коефициент на наследяемост за броя на овулиралите яйцеклетки ($h^2 = 0,45$) дава надежда за по-ефективната селекцията. Всъщност развитието на панела от генетични маркери покриващи целият геном, позволява систематично да бъдат установени и картографирани индивидуалните локуси за икономически важните количествени признаци.

Настъпването на пубертета, който се манифестира с първия еструс, е последна фаза от един комплексен процес на съзряване на взаимовръзката хипоталамус – хипофиза –

ййчници. Установено е, че възрастта за настъпване на пубертета варира в твърде широки граници и зависи както от генетични, така и от средовите фактори, основен от които е храненето. Храненето на свинете е фактор, който оказва директно влияние върху репродуктивните им способности. Оптималното съчетаване в комбинираните фуражи на необходимите хранителни вещества оказва директно влияние върху протичането на физиологичните процеси в организма, включително и на тези, имащи отношение към репродуктивната система – производството на гонадотропни хормони, протичането на естралните цикли, получаване на гамети с висока оплодителна способност и т.н. Усиленото приемане на енергия (3,5 – 4 кг. фураж на ден) през периода преди заплождането (флъшинг), или през първия ден от еструса може да повиши степента на овулация, а с това и потенциалната плодовитост.

В заключение изпитване влиянието на различни био добавки в т.ч. растителни и животински екстракти върху генетичната експресия за стопански важни признаци са обект на множество проучвания, които са и ще продължат да бъдат актуални за оптимизиране продуктивността на селскостопанските животни.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Литературният преглед представлява ретроспекция за използването на различни биоактивни вещества и натурални добавки върху репродуктивните способности на изпитваните животни. Представеният преглед на литературата е достатъчен по обем - 34стр. като напълно отразява възможностите за определяне въздействието на различни добавки и фитогенни компоненти върху репродуктивната система на лабораторни и селскостопански животни.

Обобщени са редица изследвани и вероятния механизъм на действие свързани с:

1. Натурални добавки: Спирулина (*Arthrospira platensis*), Вемохерб Т (*Tribulus terrestris*), Хомогенат от търгиеви ларви, Ауфертин (AyuFertin), Провит Е 10% супер и Орегонин
2. Биоактивни субстанции: полифеноли, мастни киселини, витамини, минерални вещества, макро и микроелементи.

Представеният сравнителен анализ на изследваните натурални добавки, както и допълващото и синергетично въздействие на биологично активни субстанции дават възможност за предварителна оценка на очакваните резултати. Същите представляват обобщение на цитираните литературни източници, което има положителен ефект за изясняване на необходимостта от провеждане на предвидените изследвания.

V. Цел и методичен подход

Целта е насочена към проучвания за комплексна оценка на някои нутригенни фактори върху репродуктивната система на мъжки и женски индивиди. Детайлно са посочени с какъв животни са проведени изследванията. Представените хипотези са послужили за формулиране на изследователските задачи. В този случай намирам, че мястото на хипотезите не трябва да бъде отразявано в целта на проучването.

Методическата постановка на проведените опити е правилна и насочена към решаване на поставената цел в проучването. Обемът на проведените изследвания показва значима изследователска дейност, включваща 10 експеримента с 199 женски и 9 мъжки животни, от които 75 лабораторни мишки, а останалите са селскостопански животни. Използваните методи за оценка на ефекта от изпитваните биоактивни добавки включва разнообразни хистологични методи, оценка нивата на определени хормони, PCR-анализи, спектрофотометрия, ултрасонография и статистически анализи. Детайлно е представен всеки един експеримент, посочени са контролираните признаци и методите за статистически анализи. Всичко това показва възможностите на автора за водене на задълбочени изследвания и интерпретация на резултати от биохимични и генетичен характер.

Проведените научно-стопански опити и лабораторни анализи са с достатъчен брой животни и обхващат основните репродуктивни признаци, което е предпоставка за представяне на надеждни и достоверни резултати.

VI. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи

Изпитването на различни биоактивни компоненти и влиянието им върху репродуктивната система при различни видове животни са оскъдни и провокират интерес за провеждане на тези проучвания. Изследваните добавки имат антиоксидантни свойства, антибактериален ефект, стимулират имунитета, което ги обединява въпреки различният им произход.

Интерпретацията на резултатите е правдива и достоверно отразява закономерностите характеризиращи произтичащите от нея изводи. Проведените анализи и установените от тях резултати показват възможностите за подобряване ефективността на репродуктивната система главно при женски животни и до известна степен и за мъжките индивиди.

Обобщение на получените резултати би могло да покаже цялостния обем и характера на проведеното изследване. Препоръчвам на автора да се съсредоточи в генетичните изследвания като насочи своите усилия и върху други гени свързания с репродуктивните способности на животинските организми.

Изводите отразяват точно получените резултати. В това отношение общите изводи са описателни. Изводите характеризиращи въздействието на изследваните добавки и фитогенни компоненти са представени в съответствие с поставените задачи, които по мое мнение са успешно разработени. Същите дават основание на автора да направи ценни препоръки с фундаментален и приложен характер.

VII. Приноси на дисертационния труд

Анализът на резултатите, както и произтичащите от тях изводи и препоръки ми дават основание да формулирам следните приноси:

Оригинални приноси

1. Свързани с въздействието на изследваните биодобавки с фитогенни компоненти върху репродуктивна система на женски и мъжки индивиди.

- Доказани са промени в нивата на стероидните хормони в женския организъм при различни видове животни след подхранване със Спирулина, Хомогенат от търтеевы ларви и Ауфертин.

- Хормоналните промени в резултат на подхранване със Спирулина, корелират с промените на метаболитните хормони (грелин), стимулират фоликулогенезата, узряването на гаметите, и раждането на здраво потомство.

- Прилагането на Ауфертин от 21-ия ден след отелването увеличава с 40.5% честотата на бременност на биволици, както и раждането на четири малачета в рамките на една година след отелване спрямо едно малаче в контролната група.

- При зайкини, подхранени със Спирулина и Трибестан, оцеляват по-голям брой приплоди на 14-я ден след раждането, като живото им тегло на 20-я ден е с над 20% по-високо в сравнение с контролните животни.

- Получени са доказателства за подобрена сперматогенеза при нерези след подхранване със Спирулина.

2. Изследвания на ефектите от използване на натуралните добавки върху митохондриите в репродуктивната тъкан и гаметите:

- Доказано е, че подхранването със Спирулина *in vivo* увеличава активността на цитохром С оксидазата, като нараства броя овулиралите ооцити след суперовулация.

- Чрез оцветяване с брилиант крезил блу и митохондриална боя JC9 бяха доказани по-голямо развитие на ооцитите, и наличието в тях на по-добре функциониращ митохондриален апарат за свине, получавали Спирулина в периода на половото съзряване.

- Получени са доказателства, че броят копия мтДНК и експресията на протеин MTND1 в овариалните клетки се увеличават под въздействие на биодобавка с артишок, богат на полифеноли.

- Увеличената функционалност на митохондриалния апарат в ооцитите и кумулусните клетки води до успешна суперовулация на животните, получавали артишок.

- Експерименталната работа *in vitro* доказва, че третирането с екстракт от кора на *Alnus incana*, съдържащ пречистен полифенол орегонин с висока антиоксидантна активност, води до по-голям брой копия мтДНК при мишите ембрионални фибробласти. Авторското право защитено и с патент №15451: Remedy for increasing mitochondrial DNA in mammalian cells.

- Получени са доказателства за увеличаване и поддържане на митохондриалната активност при *in vitro* съхраняване на сперматозоиди от коч при 5°C с добавка на орегонин към разредителя.

- Чрез нитроблу тетразолиев тест е доказано по-добро функциониране на митохондриите и поддържането на по-добър оксидоредукционен баланс в мъжки гамети на нерези след подхранване със Спирулина.

3. Приноси свързани с нутригеномния ефект на натуралните добавки:

- Установено бе, че подхранване с добавките Спирулина, ВемоХербТ и хомогенатът от търтееви ларви променя непосредствено експресията на ооцит-специфичните растежни фактори, кодирани от гени GDF9 и BMP15 в ооцитите и кумулусните клетки при зайци и свине. Нутригеномният ефект на Спирулина, ВХТ и ГТЛ рефлектира в по-голям брой и по-голям диаметър на растящите фоликули, а промените в съотношението на експресията на GDF9/BMP15 рефлектира върху броя узряващи ооцити.

- Експериментално доказана е наследяемост на променената експресия на ген BMP15 в ооцитите при второ поколение зайци, получавали добавките Спирулина и Трибестан.

- Установено е, че биодобавка с артишок с високо полифенолно съдържание променя експресията на гените, кодиращи ензими, отговорни за метилирането на ДНК, в

ооцитите и кумулусните клетки. Подхранването преди суперовулация с добавка, съдържаща фитогенни компоненти, води до по-голям брой епигенетично зрели ооцити.

- В експеримент с клетъчен модел на ембрионални миши фибробласти е доказано, че полифенолът орегонин предизвика промяна в експресията на гените, кодиращи ДНК-метилтрансферази, патент N 15385: „Agent for decreasing activity of methyltransferase in mammal cells“.

Приноси с иновативен характер

По темата на дисертационния труд са получени два патента. Иновативни са и всички изследвания с *A.platensis* (спирулина), *T.terrestris*, *хомогенат от търтмееви ларви*, **ПровитЕ10% Супер и Ауфертин и полифенол орегонин от кора на елиа.**

Получените резултати и формулираните приноси са основа за разработване на нови технологии за оптимизиране на суперовулацията и за повишаване на репродуктивния потенциал на животните.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Представените към дисертационния труд 12 публикации са предварително рецензирани, като отбелязвам, че същите са публикувани в реферирани списания, а седем от тях са списания от първия квартал – Q1. Това ми дава основание да не извършвам повторно рецензиране на приложените научни трудове.

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Позволявам си да отправя към автора следните препоръки:

1. Потвърдителният характер на някои от приносите е подкрепен от цитираните литературни източници, посочени в тях.
2. Представеният в приложението състав на някои от биодобавките на руски и английски език е необходимо да се предложи в превод на български.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на приложените, от доц. д-р Кистанова, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични

длъжности в Тракийски Университет – Стара Загора, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

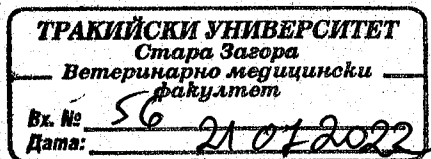
Въз основа на гореизложеното предлагам да се присъди на доцент д-р Елена Кузминична Кистанова научната степен **“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”** в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“

Дата: 14.07.2022 година

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:

проф. дн Апостол Апостолов





REVIEW

Concerning DSc thesis 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".

Title of the DSc thesis: *"Targets of bioactive additives with phytogetic components in the reproductive system"* presented by Associate professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD

Reviewer: Professor Apostol Petrov Apostolov, DSc from the Agricultural Institute-Shumen, appointed as a member of scientific jury by Order No1850/15. 06. 2022 г on the base of Art.4(3), (4) of the Law on development of academic staff in Republic of Bulgaria, Art.5(3) of the Regulations of it application in Trakia University and on the Decision of the Faculty board of the Faculty of Veterinary Medicine No28/14.06.2022.

I. Information about the career development of the candidate

Associate professor Elena Kuzminichna Kistanova completed the high education in Penza State Pedagogical Institute, Russia in 1980. In 1985 she obtained the educational and scientific degree "Candidate of Biological Sciences"(Doctor), approved by Bulgarian Board of Higher Commission of Attestation No. 1949 of 13.05.1993. Dr. E.Kistanova has been conducting research on the reproduction of livestock animals since 1989 up to now successively in the Institute of Animal Sciences - Kostinbrod and in the IBIR - BAS as in 2009 acquired the academic position "Associate Professor" in the scientific specialty "Breeding of agricultural animals, biology and biotechnology of reproduction" code 04.02.01, in IBIR-BAS. She held managerial positions as an expert in the international cooperation department, and in 2011-2014 as a deputy director of IBIR-BAS.

Her general publication activity includes over 110 publications (of which 12 related to the dissertation) and 70 abstracts with more than 200 citations. She has implemented more than 20 scientific projects (of which 6 related to the dissertation topic) with international funding as well as with funding of the Ministry of Education and Science of Bulgaria, of which I distinguish her participation as an expert in a project under the VII - Framework program "ReProForce".

The submitted self-abstract contains sufficient information about the used methods, results and the conclusions derived from them and can be given for printing.

The overall research activity and career development characterize Associate professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD as an outstanding scientist and highly qualified specialist in the field of reproduction of livestock animals.

II. Structure of the DSc thesis

The presented thesis is written on 216 pages as includes 447 bibliographical sources, of which 442 are in Latin. The dissertation is illustrated by 43 figures, including graphs, schemes and photos, as well as by 39 tables. The thesis contents typical sections as follow: introduction and literature review - 43 pages, objectives, material and methods - 20 pages, results and discussion - 63 pages, directions and perspectives of research on the natural bioactives, conclusions and recommendations - 6 pages. The analysing the volume and structure of the thesis give me base to make a statement that the presented dissertation paper covers all requirements and criterions for its development.

III. Relevance of the problem

The application of new strategies and tools for the organization and management of the breeding process led to significant changes in the reproductive abilities of individuals. The estrous cycle of female animals and the sexual activity of males are controlled by gonadotropic hormones (FSH-follicle-stimulating hormone and LH-luteinizing hormone), which in turn determine the levels of steroid hormones. It was found that the hormones level trait is characterized from medium to high heritability (androstenone and pheromones – $h^2 = 0.55$).

Much of the genetic variation in ovulation, number of embryos, and number of offspring are determined by the action of the mother's genes, except for fecundity, where heritability is low for both sexes. The high coefficient of heritability for the number of ovulated eggs ($h^2 = 0.45$) gives hope for more effective selection. In fact, the development of a genome-wide panel of genetic markers allows the systematic identification and mapping of individual loci for economically important quantitative traits.

The onset of puberty, which manifests itself with the first estrus, is the last phase of a complex process of maturation of the hypothalamus-pituitary-ovary relationship. The age of puberty onset has been found to vary widely and is dependent on both genetic and environmental factors, the main of which is nutrition. Feeding pigs is a factor that has a direct impact on their reproductive abilities. The optimal combination of the necessary nutrients in compound feeds has a direct impact on the physiological processes in the body, including those related to the reproductive system - the production of gonadotropic hormones, the estrous cycles duration, obtaining gametes with high fertility, etc. Increased energy intake (3.5-4 kg of

feed per day) during the pre-fertilization period (flushing) or during the first day of estrus can increase the ovulation rate and thus the potential fertility.

In conclusion, testing the influence of various organic additives, including plant and animal origin, on the genetic expression of the economically important traits is the subject of numerous studies that are and will continue to be relevant for optimizing the productivity of farm animals.

IV. Literary awareness and theoretical knowledge of the candidate

The literature review of the thesis is a retrospection of the use of various bioactive substances and natural supplements for stimulation of the reproductive performance of investigated animals. The presented literature review is sufficient in volume - 34 pages as fully reflecting the possibilities to determine the impact of various additives and phytogetic components on the reproductive system of laboratory and farm animals.

There are summarized a number of studies and the likely mechanism of action related to:

1. Natural supplements: Spirulina (*Arthrospira platensis*), Vemoherb T (*Tribulus terrestris*), drone brood homogenate, AyuFertin, Provit E 10% Super and Oregonin.
2. Bioactive substances: polyphenols, fatty acids, vitamins, minerals, macro and microelements.

The presented comparative analysis of the investigated natural supplements, as well as the complementary and synergistic effect of biologically active substances, enables a preliminary assessment of the expected results. The summary of the cited literary sources at the end of this section is very important for clarifying the relevance and need to conduct the planned research.

V. Objective and methodical approach

The main goal of the study is a complex evaluation of some nutrigenomic factors influence on the reproductive system of male and female individuals. There is specified in detail, which animal's species the research was conducted with. The presented hypotheses allowed formulating the research tasks. In this case, I find that the hypotheses should not be reflected in the purpose of the study.

The methodological design of the conducted experiments is correct and aimed at achieving the goal set of the study. The volume of research carried out shows a significant research activity, including 10 experiments with 199 female and 9 male animals, of which 75

were laboratory mice and the others were livestock animals. The methods used for the estimation of the bioactive supplements effect include various histological methods, evaluation of the hormones levels, PCR-analyses, spectrophotometry, ultrasonography and statistical analyses. Each experiment has been presented in detail, the investigated parameters and methods for statistical analyzes are indicated. All this shows the author's ability to conduct in-depth research and interpret the obtained biochemical and genetic results. The conducted scientific-applied experiments and laboratory analyzes have a sufficient number of animals and cover the main reproductive traits, which is a prerequisite for presenting reliable and credible results.

VI. Significance and persuasiveness of the obtained results, interpretations and conclusions

The data about testing of different bioactive components and their influence on the reproductive system in different species of animals are scarce in the literature that provokes interest in conducting these studies. The studied supplements have antioxidant properties, exhibit an antibacterial effect and stimulate immunity, which unites them despite their different origins.

The interpretation of the results is truthful and faithfully reflects the relationship between parameters as well as the conclusions derived from it. The completed analyzes and the established results clearly show the possibilities for improving the reproductive system efficiency, mainly in female animals and to some extent also for male individuals.

A summary of the obtained results could show the overall volume and nature of the research conducted. I recommend the author to enlarge the genetic research by focusing his efforts on other genes related to the reproductive abilities of mammal animals.

The conclusions accurately reflect the obtained results. In this regard, the general conclusions are descriptive. The conclusions characterizing the impact of the investigated additives and phytogetic components have presented in accordance with the set tasks, which, in my opinion, have been successfully developed. They give the author a base to make the valuable recommendations of a fundamental and applied nature.

VII. Contributions of the DSc thesis

The analysis of the results, as well as the resulting conclusions and recommendations, give me a base to formulate the following contributions:

Original contributions

1. Related to the impact of the studied biosupplements with phytogetic components on the reproductive system of female and male individuals:

- Changes in the levels of steroid hormones in the female organism have been proven in various species of animals after feeding with Spirulina, drone brood homogenate and Aufertin.

- Hormonal changes as a result of Spirulina feeding correlate with changes in metabolic hormones (ghrelin), stimulate folliculogenesis, gamete maturation, and the birth of healthy offspring.

- Administration of Aufertin from the 21st day after calving increased by 40.5% the pregnancy rate of buffaloes, as well as the birth of four calves within one year after calving compared to one calve in the control group.

- In rabbits fed with Spirulina and Tribestan(VemoHerbT), a greater number of offspring survived on day 14 after birth, and their live weight on day 20 was over 20% higher compared to control animals.

- There is an evidence of improved spermatogenesis in boars after feeding with Spirulina.

2. Studies of the effects of using natural supplements on mitochondria in reproductive tissue and gametes:

- Spirulina treatment *in vivo* has been shown to increase cytochrome C oxidase activity in ovary led to increasing the number of ovulated oocytes after superovulation.

- By staining with brilliant cresyl blue and the mitochondrial dye JC9, a greater number of oocytes with developmental competence and the presence of a better functioning mitochondrial apparatus were demonstrated for pigs receiving Spirulina during the puberty.

- There was obtained evidence that mtDNA copy number and MTND1 protein expression in ovarian cells increased under the influence of artichoke supplement rich in polyphenols.

- The increased functionality of the mitochondrial apparatus in oocytes and cumulus cells leads to successful superovulation in animals receiving artichoke.

- Experimental work *in vitro* proved that treatment with *Alnus incana* bark extract, containing purified polyphenol oregonin with high antioxidant activity, resulted in higher mtDNA copy number in mouse embryonic fibroblasts. Copyright of these results also protected by patent No15451: Remedy for increasing mitochondrial DNA in mammalian cells.

- There was obtained an evidence for increasing and maintenance of mitochondrial activity during *in vitro* storage of ram spermatozoa at 5°C with the addition of oregonin to the extender.

- A nitroblue tetrazolium test has proven better functioning of mitochondria and the maintenance of a better redox balance in male gametes of boars after feeding Spirulina.

3. Contributions related to the nutrigenomic effects of natural supplements:

- Feeding with the supplements Spirulina, VemoHerbT and the drone brood homogenate has found to directly alter the expression of the oocyte-specific growth factors encoded by the GDF9 and BMP15 genes in rabbit's and pig's oocytes and cumulus cells. The nutrigenomic effect of Spirulina, VHT and DBH reflected in a larger number and larger diameter of growing follicles as well as the changes of the expression ratio of GDF9/BMP15 reflected in the number of maturing oocytes.

- Heritability of the altered BMP15 gene expression in the oocytes of the second generation of rabbits that received the supplements Spirulina and Tribestan was experimentally proven.

- Rich-polyphenolic supplement artichoke has found to alter the expression of genes encoding enzymes responsible for DNA methylation in oocytes and cumulus cells. Pre-superovulation feeding with a supplement containing phytogetic components results in a higher number of epigenetically mature oocytes.

- In an experiment with a cell model of embryonic mouse fibroblasts, there was proven that the polyphenol oregonin caused a change in the expression of genes encoding DNA-methyltransferases, patent No 15385: "Agent for decreasing activity of methyltransferase in mammalian cells".

Innovative contributions

Two patents have been obtained on the subject of the dissertation work. All the research with *A.platensis* (Spirulina), *T.terrestris*, drone brood homogenate, ProvitE10% Super, Aufertin and polyphenol oregonin from alder bark have been also innovative. The obtained results and formulated contributions are the basis for developing the new technologies to optimize superovulation and to increase the reproductive potential of animals.

VIII. Publication activity and evaluation of the quality of scientific publications

The 12 publications, submitted to the dissertation, have been previously peer-reviewed, noting that they were published in peer-review journals as seven of them are journals from the first quartile – Q1. This gives me a reason not to re-review the attached research papers.

IX. Critical notes, questions and recommendations to the candidate

I would like to make the following recommendations to the author:

1. The contributions with affirmative nature should be supported by the cited references indicated them.

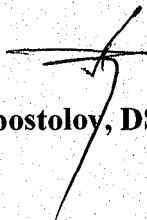
2. The composition of some bio-supplements, presented in the appendix in Russian and English, must be translated into Bulgarian.

CONCLUSIONS:

Based on the applied various research methods, on the correctly performed experiments and on the achieved generalizations and conclusions by Associate professor Kistanova, PhD, I consider that the presented DSc thesis complies the requirements of the Law on development of academic staff in Republic of Bulgaria and the Regulations on the terms and conditions for acquiring scientific degrees and for occupying academic positions at Trakia University - Stara Zagora, which gives me a reason to estimate it **POSITIVELY**.

Based on the above, I recommend awarding Associate Professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD the scientific degree "**DOCTOR OF SCIENCES**" in the field of higher education 6. "Agrarian sciences and veterinary medicine", professional direction 6.4. "Veterinary medicine", scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals".

Date: 14.07.2022

Review prepared by: 
(Professor Apostol Apostolov, DSc)