



## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН

относно: дисертационен труд на Десислава Василева Абаджиева от ИБИР-БАН

на тема „**ОЦЕНКА НА ЕФЕКТА ОТ БИОЛОГИЧНО АКТИВНИТЕ ХРАНИТЕЛНИ ДОБАВКИ SPIRULINA PLATENSIS И ВЕМОХЕРЬ-Т ВЪРХУ РЕПРОДУКЦИЯТА НА ЖЕНСКИ ЗАЙЦИ**“

за получаване на образователна и научна степен „Доктор“

по научна специалност: “Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването” (04.02.01)

Проектът на дисертационния труд на Десислава Абаджиева е адресиран към проблем от съществено значение за репродукцията на домашните животни, отличаващ се не само с висока актуалност, но и с иновативна перспектива. Въпросите свързани с ефекта на качеството на храната върху репродуктивните възможности на домашните животни третира три приоритета с национално и международно значение – репродуктивно здраве, качество на храни и опазване на околната среда. В дисертацията на Десислава Абаджиева се преплитат първите две приоритета, което несъмнено отразява нейното съвременно измерение. Трудът се простира с широк обхват от организмови до молекулярно-биологични изследвания при използване на класически и най-съвременни методи.

Дисертационният труд е написан на общо 172 страници и е структуриран по общоприетия начин с разпределение на отделните раздели, както следва: Резюме на английски език – 2 стр.; Въведение – 2 стр.; Литературен обзор - 37 стр.; Цел и задачи – 3 стр.; Материали и методи – 25 стр.; Собствени резултати – 53 стр.; Дискусия – 16 стр.; Заключение и перспективи – 2 стр.; Изводи – 2 стр.; Приноси – 2 стр.; Препоръки – 1 стр.; Литература – 14 стр.; Приложения – 5 стр. Основните раздели са в балансирано съотношение, като логично най-обемист от тях е този за собствените резултати (една трета от целия труд).

Литературният обзор е целенасочено развит с оглед темата на труда и се отличава с ясен и стегнат стил. Структуриран е в три глави, които са насочени към разработваната тема– фоликулогенеза, качество на овоцитите и гените, имащи отношение към тези процес. Предоставена е изчерпателна информация относно биологичната активност на изследваните хранителни добавки, основите на овогенезата при зайкини и влиянието на хранителните режими върху женския репродуктивен потенциал. В него се откроява критичното отношение на авторката при интерпретация на литературните данни, поради тяхната непълнота и противоречивост. Това особено се отнася до влиянието на хранителните режими върху женската репродукция и до ролята на двата изследвани от авторката гена, *gdf-9* (растежен диференциационен фактор-9) и *bmp-15* (костен морфогенетичен фактор) в процеса на фолкулогенезата при зайци. Интересът към *gdf-9* и *bmp-15* е напълно основателен от гледна точка на последни данни от генетични модели с таргетно унижощаване на тези два гена. Например, *knockout* на *gdf-9* води до блокиране на фоликулогенезата на стадий първичен фоликул, а при мишки с *knockout* на *bmp-15* фоликулогенезата протича нормално, но по-късно настъпват дефекти при овулацията и ембриогенезата. Впечатлена съм от високата компетентност и съвременното виждане на дисертантката по изследвания проблем, базирани

на познаване на последните публикации на водещи учени/екипи в световен мащаб. Това се доказва с използваните 225 литературни източника, 6 на кирилица и 213 на латиница и 6 източника от итернет. Една четвърт от цитираните статии са от последните 5 години, и повече от половината са от последните 10 години, което недвусмислено показва актуалността на разработвания проблем. В края на прегледа е изведено заключение с неизяснените въпроси. С това формулировката на целта звучи ясно и логично. Поставени са 7 задачи, които убеждават за пълното изпълнение на целта. Нещо повече, посочена е иновативността на разработваната тема, от което става ясно, че трудът е оригинално замислен със съвременно виждане за неговото изпълнение, за да се получат нови данни от съществено значение за подобряване на репродуктивния потенциал на женските зайци.

Проведено е оригинално проучване на ефектите от два препарата от естествен произход (стандартна семеска от синьо-зелено водорасло *Spirulina platensis* и препарат Вемохерб-Т, изолиран от билката бабини зъби - *Tribulus terrestris*) върху репродуктивния потенциал на женски зайци и тяхното женско потомство (второ поколение). Трудът е изключително прецизно и професионално изпълнен с прилагане на адекватен експериментален дизайн и комплекс от съвременни морфометрични, имунохистохимични и молекулярно биологични методи, клетъчни култури и микроманипулационна техника за изолиране на овоцити. В раздела „Материали и методи“ достатъчно информативно е описан експерименталния модел за хранене на зайкините-майки с изследваните две добавки. За добавката Вемохерб-Т дисертантката е провела пилотен експеримент с три дози с цел намиране на оптималната доза от 3мг/кг. Броят на използваните контролни и опитни животни е по 7 от всяка група и е достатъчен за коректна и надеждна статистическа обработка на количествените данни. Комплексният методологичен подход е силна страна на дисертационния труд и гарантира пълнота и надеждност на получените данни. Той се изразява в съчетаване на ин vivo и ин vitro експерименти, в които са проведени измервания на макропараметри (тегло на зайкини-майки и тяхните дъщери в началото и края на опита, брой новородени от една майка, процент на тяхната смъртност, тегло на яйчниците) и микропараметри (диаметри на фоликули и яйцеклетки в отделните етапи на фоликулогенезата, процентен обем на яйцеклетките спрямо този на фоликулите, брой фоликули за единица площ/плътност на разпределение). Количествено са определени експресията два гена *gdf-9* и *bmp-15* (посредством *real time PCR* с ) и кодираните от тях протеини, *GDF-9* и *BMP-15* (посредством АВС имунохистохимия и измерване интензитета на имунохистохимичната реакция). Двата гена и тяхните продукти са от ключово значение за клетъчната диференциация в хода на фоликулогенезата. За морфометрия е използвана система за анализ на микроскопски образи с използване на софтуерен продукт *Image J*. Тук искам да изтъкна огромния обем от измервания, проведени от Десислава Абаджиева – това са измервания на диаметри на фоликули и овоцитите в тях заедно с процентния обем на овоцита спрямо фоликула, и фоликулна плътност през всичките четири стадии на фоликулното съзряване (първичен, вторичен, преантрален и антрален фоликул). Морфометричният анализ на микропараметрите е надграден и с количественото определяне интензитета на имунохистохимичната реакция на двата протеина *GDF-9* и *BMP-15*, показателна за нивото на тяхната експресия. За статистическата обработка на данните е използван специализиран софтуер, с който са проведени Т-теста на Стюдънт, тест за преживяемост (Каплан-Майер анализ) и линейно корелационен анализ. Прави впечатление, че използваните методи са представени по начин, позволяващ тяхното възпроизвеждане. Нещо повече, усърдно са дадени списъци с използваните реактиви, консумативи и апаратура. Посочени са марка/производител, модел или каталожен номер, както и рецептите на използваните буфери и разтвори.

Раздел „Резултати“ е структуриран в четири подраздела, представящи данните от изследванията върху зайкини-майки, хранени с *Spirulina platensis* (СП) и Вемохерб-Т (ВХТ) и ефекта върху тяхните дъщери. Тук искам да изтъкна прецизността от работата на авторката в провеждане целия набор от изследвания и съответните методики в 4-те експериментални групи, без да липса и най-малката подробност. Получени са голям обем от данни, представени систематично и прегледно, което допълнително улеснява читателя. Накратко, резултатите на авторката и тяхният приносен характер могат да се обобщят, както следва:

1. Установени са по-високи репродуктивни параметри при зайкини 1-во и 2-ро поколение, приемали СП. По отношение на макропараметрите е установено повишение в броя новородени от една майка, процента на преживяемост на новородените, дневния прираст на малките, теглото на яйчниците. Увеличени са стойностите на микропараметрите – диаметър на вторични и антрални фоликули и овоцитите в тях, като статистическа достоверност липсва при клетъчните диаметрите при зайкините-майки. Обемът на овоцита и неговият процентен дял спрямо фоликула е значимо по-висок в преантралните фоликули. Плътността на разпределение на фоликулите е достоверна при първични и вторични фоликули, като тази тенденция се запазва само за вторичните фоликули при дъщерите. Посочените до тук данни на дисертантката са пионерни за белия новозенландски заек и са в унисон с данните от литературата за лабораторни и други домашни животни.
2. Добавката ВХТ подобрява репродуктивните макропараметри в по-ограничен диапазон и това се отнася до процента на преживяемост на малките и тегло на яйчниците при зайкини 1-во и 2-ро поколение. По отношение на микропараметрите статистическа достоверност се досига при диаметрите на вторични и преантрални фоликули при зайкините-майки. При овоцитите на преантралните фоликули дори се отчитат и пониски стойности в опитната група. Заедно с последната находка в някои преантрални и антрални фоликули са наблюдавани дегенеративни тела в гранулозните клетки (атретични телца), показателни за атрезия на самия фоликул. С оглед установените атретични промени, Абаджиева препоръчва по-внимателен подбор на прилаганата доза. Плътността на разпределение на фоликулите е достоверна при първични и вторични фоликули на зайкините-майки и при преантралните фоликули на дъщерите. Резултатите на авторката са в унисон с представата, че ВХТ активира яйчниковия резерв стимулира развитието на фоликулите.
3. Приложен е иновативен математически модел, доказващ висока корелация между диаметъра на фоликулите и плътността им на разпределение в яйчниците на контроли и опитни и зайкини, приемали СП или ВХТ, както и при техните дъщери.
4. За първи път са установени ефектите на хранителните добавки, СП и ВХТ върху експресията на два гена, *gdf-9* и *bmp-15* (ключови за клетъчната диференциация) при зайкини 1-во и 2-ро поколение. Стимулиращият ефект на добавките при майките е посилен от този при дъщерите, което корелира с по-изразеното покачване в диаметъра на вторичните фоликули. Доказано е, че двата гена са подходящи маркери за оценка влиянието на външни фактори, като хранителните режими върху фоликулогенезата и качеството на яйцеклетките.
  - в зайкини-майки, приемали СП, е установена повишена експресията *gdf-9* и *bmp-15* в овоцити и кумулусни клетки, като статистическа значимост липсва само при *gdf-9* в кумулусните клетки.
  - в зайкини-майки, приемали ВХТ, е установена значително повишена експресия на *gdf-9* и *bmp-15* в двата типа клетки, с изключение на *bmp-15* в овоцитите, където има тенденция на потискане.

5. Количественото измерване на експресията на двата протеина, GDF-9 и BMP-15, показват специфичните модели на локализация на двата фактора в хода на фоликулогенезата. Експресията нараства в цитоплазмата на овоцита в ранните етапи (примордиален-първичен фоликул), след което тя намалява, но се засилва в гранулозните клетки и стромата при развитието на фоликула от вторичен към антрален. Промените в експресията на GDF-9 и BMP-15 след приемане на добавките СП или ВХТ са сходни с тези от експресията на кодиращите гени (*gdf-9* и *bmp-15*). От друга страна, данните за повишена експресия на двата гена и кодираните от тях протеини корелират с морфометричните данни за стимулирана фоликулогенеза.

Дисертационният труд е онагледен с 39 таблици, 23 графики, 6 схеми и 4 приложения. Имунохистохимичните реакции са демонстрирани с 108 микроснимки, представени в 17 множествени фигури с високо качество.

Дискусията е стегната, като постоянно се съпоставят собствените данни с тези от литературата, при което ясно изкрystalлизират оригиналните находки. Точно и ясно са формулирани 12 извода – 6 за ефекта на *Spirulina platensis* и 6 за Вемохерб-Т. Изведени са 9 оригинални приноса и са дадени 3 препоръки от полза за подобряване на репродуктивните параметри на женските зайци. В тази си част дисертационният труд е усъвършенстван в сравнение с неговия проект. Изводите от 9 са станали 12 и са формулирани по-пълно и по-точно. Приносите са оформени в оригинални – 9 и потвърдителни – 4. Оригиналността на изследванията на дисертантката би могла да се обобщи в четири направления:

- 1) доказване на положителен ефект на СП върху репродуктивния капацитет на зайкини-майки и определяне на оптималната доза на ВХТ;
- 2) проследяване положителното въздействие на СП и ВХП, приемани само от майката, върху репродуктивния потенциал на женското потомство;
- 3) разработване и прилагане на комплексен морфометричен подход за оценка фоликулното съзряване при зайкини порода Новозенландска бяла;
- 4) доказана е различна чувствителност на гените *gdf-9* и *bmp-15* в овоцити и кумулусни клетки към СП и ВХП в зайкини първо и второ поколение. По-чувствителен е генът *bmp-15*, тъй като промените в неговата експресия се онаследяват във второ поколение.

Авторефератът е достатъчно информативен и представя в синтезиран вид есенцията на труда. Авторката би могла в него да посочи препоръките, които тя е предоставила в дисертацията си.

Във връзка с дисертацията се публикувани 3 статии, две в национални списания и една в международно издание. Представени се две участия в научни форуми – едно у нас и едно в чужбина. Дисертантката е участник в три проекта, единият от които е международен. Тя е била на три едномесечни специализации в чужбина – две в Университета във Вагенинген, Холандия и една в Университета „Мартин-Лутер“ в Хале, Германия. Запознавайки се с цялостната публикационна дейност на Десислава Абаджиева съм възхитена от нейния висок актив, изразяващ се в общо 34 публикации до момента, от които са забелязани 26 цитирания на 11 статии.

Имам една препоръка от техническо естество, която да е от полза в по-нанатъшните морфометрични изследвания – да се определя процентът на повишаване/намаляване на количествените параметри при опитните животни спрямо контролите, което би дало допълнителна информация за степента на промените.

В заключение, обемът и качеството на проведеното комплексно морфометрично и молекулярно-биологично изследване определят дисертационния труд на Десислава Абаджиева, като завършена и прецизно осъществена научна разработка с ясно изразено практическо значение и иновативност. Оставам силно впечатлена от високото научно ниво и професионализъм на изпълнение на дисертационния труд и от изискания научен стил при неговото написване и оформяне. Представените данни от Десислава Абаджиева несъмнено убеждават в положителния ефект на хранителните добавки, СП и ВХТ, върху развитието на фоликулите при новозеландски зайкини и тяхното женско потомство. Авторката доказва този ефект с прилагане на адекватен експериментален модел, като е провела подробен пионерен морфометричен анализ, съчетан с оригинално изследване върху експресията на двата ключови гена *gdf-9* и *bmp15*. Обемът и качеството на труда и успешното изпълнение на образователната и научна програма напълно покриват критериите на ЗРАС на РБ и съответните правилници за неговото приложение. С придобитите знания и умения Абаджиева е изграден учен, способен за самостоятелна научно-изследователска работа. Във връзка с горе-изложеното, с висока убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на тема „Оценка на ефекта на биологично-активните хранителни добавки *Spirulina platensis* и Вемохерб-Твърху репродукцията на женски зайци” и препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват „ЗА” присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Десислава Абаджиева.

09.02.2015 г.

Рецензент:



/проф. Нина Атанасова, дбн/