

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. Даниела Пехливанова, д.м.

Институт по невробиология, Българска Академия на науките

Относно: Защита на дисертационния труд на **редовен докторант Калина Стефчова Илиева**, зачислена към катедра „Анатомия, цитология, хистология и биология“, МУ-Плевен във връзка с процедура по присъждане на научната и образователна степен „Доктор“ по докторска програма „Медицинска биология“.

Със заповед на Ректора на Медицински университет-Плевен № 1024/ 02.04.2025 г. съм определена за член на научно жури по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“. С решение на НЖ от 08.04.2025 г. съм определена да изготвя рецензия на дисертационния труд на редовен докторант Калина Стефчова Илиева на Тема: *„Ефекти на мелатонинергични препарати върху животински модели на невродегенеративни заболявания“*.

1. Кратки биографични данни

Калина Стефчова Илиева е завършила средното си образование в Техникум по Химични Технологии - гр. Плевен – „Технологичен и микробиологичен контрол“ през 2001г. През 2008 г. тя завършва магистратура в СУ “Св. Климент Охридски”, специалност „Биотехнологии“. От 2012 г. е асистент, а през 2018 г. придобива специалност по „Медицинска биология“ в МУ-Плевен. Асистент Калина Илиева е преподавател от 2022 г. по учебно-практически занятия със студенти по медицина АЕО по „Биология на човека“, учебно-практически занятия със студенти по медицина БЕО по „Биология на човека“ и е участвала в семинари и упражнения по "Биология" на студентите от ДЕСО на английски език. Тя разработва докторантура по докторска програма „Медицинска биология“ и през 2023г. е отчислена с право на защита. Научните интереси на докторантката са разнообразни и са насочени главно към растителни биотехнологии, репродуктивна имунология и невродегенеративни заболявания. Асистент Илиева владее английски език писмено и говоримо и немски език на работно ниво. Тя членува в Съюз на учените в България и Българско дружество по медицинска биология.

2. Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е разработен върху класическата форма на организация, 147 страници, които включват:

- Въведение; Литературен обзор – 41 страници; Цел; Ясно формулирани 6 задачи; Методи описани на 11 страници; 41 страници резултати; 25 фигури, 2 таблици и 6 схеми; 7 изводи; 7 оригинални и 3 потвърдителни приноса; Приложения с включени списъци на научните статии по дисертационния труд (3 статии), участия в научни форуми (4 участия) и реализирани проекти по дисертационния труд (2 проекта); Библиография с 167 източника; Резюме на английски език.

3. Актуалност на темата и съответствие с поставените цели.

Диагностиката на Болестта на Алцхаймер (БА) бележи значителен ръст, свързан с фактори от различен произход – технологични, екологични, социални и други. Основният фактор за развитието на БА от доминиращия спорадичен тип е стареенето и свързаните с него промени в метаболитния баланс на ключови за патогенезата на заболяването протеини. Проучванията свързани с разкриването на механизмите на етиологията на БА и търсенето на нови потенциални терапии от комплексен характер придобива все по-голямо значение с нарастването на продължителността на живота в икономически развитите страни. Хормонът мелатонин участва в контрола на почти всички системи на организма, като осигурява синхронизиране на техните функции с денонощните и сезонни ритми. Наред с това, все повече експериментални данни подкрепят хипотезата за ролята на мелатонина в контрола на оксидативния статус и мозъчната активност. Това поставя акцент върху потенциала на естествения хормон и неговите синтетични и полусинтетични производни за възстановяване на нарушените функции и използването на такива препарати в терапията на редица хронични заболявания.

Настоящият дисертационен труд е развит върху добре обоснованата хипотеза за връзка между патогенезата на БА и коморбидното депресивно разстройство, както и участието на мелатонинергичен механизъм в развитието на симптомите и потенциалното им подобряване. Целта на изследването е ясна и кратко формулирана: Да се проучи ефикасността на антидепресанта агомелатин, прилаган профилактично или палиативно, върху патогенезата индуцирана чрез интрацеребровентрикуларна инфузия на токсини и свързана с поведенчески, биохимични и клетъчни аномалии при два животински модела на БА. Задачите свързани с изпълнението на поставената цел са конкретни и включват индуциране и верифициране на два утвърдени експериментални модела на БА, както и проучване ефектите на агомелатина върху патогенезата им на различни нива: биохимично, хистологично и поведенческо.

4. Анализ на литературата по изследвания проблем.

Въведението е подходящо и подготвя читателя за разглеждания по-нататък научен проблем. Литературният обзор обобщава данни и обяснява много добре известните досега генетични и биохимични механизми, свързани с образуването на плаки от агрегирал амилоид-бета, както и на вътреклетъчни неврофибриларни възли от хиперфосфорилиран тау-протеин като основни биомаркери на БА. Подробно е разгледана етиологията на БА и депресивното разстройство. Допълнена е секция, която разглежда досега съществуващите фармакологични подходи за третиране на БА, със съответните недостатъци и нежелани странични ефекти. Отделна секция разглежда критично състоянието на изследвания проблем в светлината на световните научни постижения в областта. Всички предварителни бележки, които бях отправила с цел подобряване на качеството на дисертационния труд бяха взети предвид и отчитам, че са направени корекции в текста.

5. Използвани методи и подходи

Описаните методи и експериментален дизайн дават реална възможност за повторение на изследването. Използвани са два алтернативни експериментални модела на деменция от Алцхаймеров тип, които са валидирани за предклинични изпитвания и имат богата литературна представителност. Подбраните методи за изследване на тревожно поведение и депресивно-подобно поведение са „златен стандарт“ при гризачи. Осем

раменния лабиринт е тест, при който може да се оцени не само увреждането на оперативната памет, но и специфично на пространствената памет, която е сред най-уязвимите при пациенти с БА. Изследваните мозъчни структури хипокамп и префронтална кора са подходящи за биохимичните тестове, защото има данни за ранни увреждания точно в тези структури преди клиничната проява на БА. Паралелното отчитане на нивата на амелойд-бета и фосфорилирания тау протеини като биомаркери на заболяването и селективните биомаркери на възпалението в едни и същи проби дава възможност за комплексна оценка на патологичните процеси в мозъка. Описаните биохимични методи са с много висока чувствителност. Количественото измерване не само на прицелните протеини, но и на ключови за биосинтезата им ензими е предпоставка за пълноценното интерпретиране на получените резултати.

Намирам направените корекции на първоначалния текст в тази част за подходящи.

6. Описание и графично представяне на резултатите от изследването.

Данните са описани изчерпателно, фигурите илюстрират подробно всеки от направените експерименти. Трябва да се отбележи, че дори след направените корекции, все още има дребни технически размествания във фигурите, което вероятно се дължи на прехвърлянето им от един програмен продукт в друг.

7. Обсъждане

Направено е изчерпателно и критично обсъждане, в което са приведени данни от литературата за сравнение с получените резултати от двата експериментални модела. Коректно са дискутирани силните и слаби страни на дисертационния труд, като е очертан потенциал за бъдещи изследвания по темата.

Посочено е, че агомелатинът се инжектира в 16 ч, но поведенческите експерименти са проведени между 10-12 ч. На следващия ден. С оглед на добре изразените ефекти на мелатонина върху денонощна динамика на поведението, бих искала да попитам, какъв е предварителният замисъл да се изследва поведението преди инжектирането на дневната доза агомелатин, което изключва острия ефект на препарата? Съгласно литературните данни агомелатинът има благоприятни ефекти върху тревожното поведение и паметта при мишки с модел на депресивно разстройство, когато е инжектиран 2-5 часа преди теста. Как докторантката обяснява ефектите му при изследваните модели на БА след по-продължителен период на инжектиране?

8. Изводи

Изводите включват най-съществените открития и са групирани съответно с проучвания механизъм.

9. Приноси

Посочените оригинални приноси подчертават значимостта на дисертационния труд като едно цялостно, пространно изследване на различни механизми, свързани с патофизиологията на БА и фармакологичното им повлияване от антидепресанта агомелатин. Потвърдителните приноси дават възможност да се проследи правилното използване на утвърдени експериментални модели и подходи.

10. Библиография

Използваната литература е богата на заглавия от последните години и е обобщена творчески. Библиографията е достатъчна по обем и е цитирана ясно. Тя включва 167 заглавия, от които 49 (около 30 %) са публикувани през последните 5 години. Прави впечатление цитирането на трудове, които са основополагащи и са публикувани през XIX век (1856 г). Тази справка показва актуалността на разработваната тема от една страна, както и задълбоченото изследване в исторически план от друга.

11. Оценка на разпространение на резултатите - публикации и участия в научни форуми.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 статии, 2 от които с висок импакт фактор и кuartил Q2: Hormones and Behavior и Physiology & Behavior. Значимостта на публикуваните данни се потвърждава и от забелязаните повече от 20 цитирания на двете статии през последните 5 години. Тези публикации покриват напълно минималните национални изисквания и тези заложи в правилника за дейността на докторантското училище в Медицински университет – Плевен.

12. Съответствие с минималните национални изисквания и правилника на МУ-Плевен.

Представената авторска справка показва, че Калина Илиева е изпълнила минималните национални изисквания за присъждане на ОНС „Доктор“ в професионална направление 7.1. Медицина с общ брой точки 89 при изискуеми 50. Докторантката е изпълнила всички критерии и показатели за оценяване от научно жури при провеждане на конкурс за присъждане на ДНС „Доктор“ в Медицински университет – Плевен.

13. Авторефератът е разработен на 58 страници и представя най-показателните резултати от направеното изследване, както и тяхното критично дискутиране в светлината на научната литература по съответната тема.

14. Заключение

Въз основа на горепосоченото считам, че дисертационния труд на Калина Илиева има завършен вид, направените оригинални експериментални изследвания са достатъчни като обем и съдържание и са дискутирани критично в светлината на предходни изследвания от литературата. Критичните ми бележки целят единствено подобряването на окончателния вид на научния труд и не намаляват неговото значение.

Всичко това ми дава основание убедено да предложа на членовете на Научното жури при Медицински университет Плевен, Калина Илиева за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Дата: 30.04.2025 г.

Подпис: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

София

REVIEW

By Assoc. Prof. Daniela Pehlivanova, PhD

Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences

Subject: Defense of the dissertation of a full-time doctoral student, Kalina Stefchova Ilieva, enrolled in the Department of Anatomy, Cytology, Histology and Biology, MU-Pleven, in connection with the procedure for awarding the scientific and educational degree PhD in the doctoral program "Medical Biology".

By order of the Rector of the Medical University-Pleven No. 1024/ 02.04.2025, I am appointed as a member of the scientific jury in the procedure for acquiring the educational and scientific degree "doctor". By decision of the Medical University-Pleven, of 08.04.2025, I am appointed to prepare a review of the dissertation work of a full-time doctoral student, Kalina Stefchova Ilieva, on the topic: *"Effects of Melatonergic Compounds on Animal Models of Neurodegenerative Diseases"*.

1. Brief biographical data

Kalina Stefchova Ilieva completed her secondary education at the Technical School of Chemical Technology - Pleven - "Technological and Microbiological Control" in 2001. In 2008, she completed a master's degree at Sofia University "St. Kliment Ohridski", majoring in "Biotechnology". Since 2012, she has been an assistant professor, and in 2018, she acquired a specialty in "Medical Biology" at MU-Pleven. Assistant Professor Kalina Ilieva has been a lecturer since 2022 in educational and practical classes with medical students EE in "Human Biology", educational and practical courses with medical students BEO in "Human Biology", and has participated in seminars and exercises in "Biology" for students from DESO in English. She is developing a doctoral program in "Medical Biology" and in 2023 is directed with the right to defend. The doctoral student's diverse scientific interests are mainly focused on plant biotechnology, reproductive immunology, and neurodegenerative diseases. Assistant professor Ilieva speaks English, written and spoken, and German at a working level. She is a member of the Union of Scientists in Bulgaria and the Bulgarian Society of Medical Biology.

2. Structure of the dissertation

The dissertation is developed on the classical form of organization, 147 pages, which includes:

- Introduction; Literature review – 41 pages; Objective; 6 clearly formulated tasks; Methods described on 11 pages; 41 pages of results; 25 figures, 2 tables and 6 schemes; 7 conclusions; 7 original and 3 confirmatory contributions; Appendices with included lists of scientific articles on the dissertation (3 articles), participation in scientific forums (4 participations) and implemented projects on the dissertation (2 projects); Bibliography with 167 sources; Summary in English.

3. Relevance of the topic and compliance with the set goals.

The diagnosis of Alzheimer's disease (AD) has seen significant growth, associated with factors of different origin - technological, environmental, social, and others. The main factor for the development of AD of the dominant sporadic type is aging and the associated changes in the metabolic balance of proteins key to the pathogenesis of the disease. Studies related to the disclosure of the mechanisms of the etiology of AD and the search for new potential therapies of a complex nature are gaining increasing importance with the increase in life expectancy in economically developed countries. The hormone melatonin is involved in the control of almost all systems of the body, ensuring synchronization of their functions with circadian and seasonal rhythms. In addition, more and more experimental data support the hypothesis of the role of melatonin in the control of oxidative status and brain activity. This emphasizes the potential of the natural hormone and its synthetic and semi-synthetic derivatives for restoring impaired functions and the use of such preparations in the therapy of a number of chronic diseases.

The present dissertation work is developed on the well-founded hypothesis of a connection between the pathogenesis of AD and comorbid depressive disorder, as well as the involvement of a melatonergic mechanism in the development of symptoms and their potential improvement. The aim of the study is clear and briefly formulated: To study the efficacy of the antidepressant agomelatine, administered prophylactically or palliatively, on the pathogenesis induced by intracerebroventricular infusion of toxins and associated with behavioral, biochemical, and cellular abnormalities in two animal models of AD. The tasks related to the implementation of the set goal are specific and include the induction and verification of two established experimental models of AD, as well as the study of the effects of agomelatine on their pathogenesis at different levels: biochemical, histological, and behavioral.

4. Analysis of the literature on the research problem.

The introduction is appropriate and prepares the reader for the scientific problem considered further. The literature review summarizes data and explains very well the known genetic and biochemical mechanisms associated with the formation of plaques of aggregated amyloid-beta, as well as intracellular neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein as the main biomarkers of AD. The etiology of AD and depressive disorder is examined in detail. A section has been added that examines the existing pharmacological approaches to the treatment of AD, with the corresponding shortcomings and undesirable side effects. A separate section critically examines the state of the research problem in the light of world scientific achievements in the field. All preliminary remarks that I had made to improve the quality of the dissertation work were taken into account, and I acknowledge that corrections have been made to the text.

5. Methods and approaches used

The described methods and experimental design provide a real opportunity for repeating the study. Two alternative experimental models of Alzheimer's type dementia were used, which have been validated for preclinical trials and have a rich literature representation. The selected methods for studying anxiety behavior and depressive-like behavior are the "gold standard" in rodents. The eight-arm maze is a test that can assess not only the impairment of working memory, but also specifically spatial memory, which is among the most vulnerable in patients

with AD. The studied brain structures, the hippocampus and prefrontal cortex, are suitable for biochemical tests because there is evidence of early damage in these structures before the clinical manifestation of AD. Parallel reporting of the levels of amyloid-beta and phosphorylated tau proteins as biomarkers of the disease and selective biomarkers of inflammation in the same samples allows for a comprehensive assessment of pathological processes in the brain. The described biochemical methods have a very high sensitivity. Quantitative measurement not only of target proteins, but also of enzymes key to their biosynthesis, is a prerequisite for the full interpretation of the results obtained. I find the corrections made to the original text in this part appropriate.

6. Description and graphical presentation of the results of the study.

The data are described comprehensively, the figures illustrate in detail each of the experiments performed. It should be noted that even after the corrections made, there are still minor technical shifts in the figures, which are probably due to their transfer from one software product to another.

7. Discussion

A comprehensive and critical discussion has been made, in which data from the literature are provided for comparison with the results obtained from the two experimental models. The strengths and weaknesses of the dissertation work have been correctly discussed, and the potential for future research on the topic has been outlined.

It has been indicated that agomelatine is injected at 4 p.m., but the behavioral experiments were conducted between 10-12 a.m. The next day. In view of the well-expressed effects of melatonin on diurnal dynamics of behavior, I would like to ask, what is the presumption to study behavior before the injection of the daily dose of agomelatine, which excludes the acute effect of the drug? According to the literature data, agomelatine has beneficial effects on anxiety behavior and memory in mice with a model of depressive disorder, when injected 2-5 hours before the test. How does the doctoral student explain its effects in the studied models of AD after a longer period of injection?

8. Conclusions

The conclusions include the most significant findings and are grouped accordingly to the studied mechanism.

9. Contributions

The original contributions mentioned emphasize the significance of the dissertation as a comprehensive, extensive study of various mechanisms related to the pathophysiology of BA and their pharmacological response to the antidepressant agomelatine. The confirmatory contributions make it possible to follow the correct use of established experimental models and approaches.

10. References

The literature used is rich in titles from recent years and is summarized creatively. The references are sufficient in volume and are clearly cited. They include 167 titles, of which 49 (about 30%) have been published in the last 5 years. The citation of works that are fundamental and were published in the 19th century (1856) is striking. This reference shows the relevance of the topic being developed on the one hand, as well as the in-depth research in historical terms on the other.

11. Assessment of dissemination of results - publications and participation in scientific forums.

The results of the dissertation work have been published in 3 articles, 2 of which with a high impact factor and quartile Q2: Hormones and Behavior and Physiology & Behavior. The significance of the published data is also confirmed by the more than 20 citations of the two articles noted in the last 5 years. These publications fully meet the minimum national requirements and those set out in the regulations for the activities of the doctoral school at the Medical University - Pleven.

12. Compliance with the minimum national requirements and the regulations of MU-Pleven.

The presented author's reference shows that Kalina Ilieva has fulfilled the minimum national requirements for awarding the PhD in professional field 7.1. Medicine with a total score of 89 out of the required 50. The PhD student has fulfilled all criteria and indicators for evaluation by a scientific jury during a competition for the award of the PhD degree at the Medical University - Pleven.

13. The abstract book is developed on 58 pages and presents the most indicative results of the research conducted, as well as the critical discussion thereof in the light of the scientific literature on the relevant topic.

14. Conclusion

Based on the above, I believe that Kalina Ilieva's dissertation work has a completed form, the original experimental studies conducted are sufficient in volume and content, and have been critically discussed in the light of previous studies from the literature. My critical notes aim only to improve the final form of the scientific work and do not reduce its importance.

All this gives me reason to confidently propose to the members of the Scientific Jury at the Medical University of Pleven, Kalina Ilieva, for awarding the educational and scientific degree PhD.

Date: 30.04.2025

Sofia

Signature: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**