

ДО

Председателя на Научно жури
по процедура за придобиване на ОНС „Доктор“
докторска програма „Медицинска биология“

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Галя Цветанова Ставрева-Маринова, д.м.
катедра „Фармакология и токсикология“
Факултет „Фармация“
Медицински Университет – Плевен

По процедура за присъждане на ОНС „Доктор“

Област на висше образование: 7. “Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: 7.1. “Медицина”

Докторска програма: “Медицинска биология”

Автор: Калина Стефчева Илиева

Форма на докторантурата: редовна форма на обучение

Тема на дисертационния труд: „Ефекти на мелатонинергични препарати
върху животински модели на невродегенеративни заболявания“

Научни ръководители: проф. Милена Атанасова, д.б.

проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова, д.м.

Представям рецензията в качеството си на член на Научно жури, определено със заповед на Ректора на МУ-Плевен (№ 1024/02.04.2025 г.) и решение от I-во неписъствено заседание на Научното жури, проведено на 08.04.2025. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, включително съавторство с дисертанта Калина Илиева.

Общо представяне на процедурата

Ас. Калина Стефчева Илиева е зачислена като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Медицинска биология“, П.Н. 4.3 Биологически науки, в Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология, Факултет „Медицина“, при Медицински университет – Плевен със Заповед № 945/19.05.2020 г. с научни ръководители проф. Милена Атанасова, д.б. и проф. Яна Чекаларова, д.м. и тема на дисертационния труд **„Ефекти на мелатонинергични препарати върху животински модели на невродегенеративни заболявания“**. Положила е успешно изпит за докторски минимум по специалността на 09.12.2022 г. След получена акредитация и промяна на професионалното направление, докторската програма „Медицинска биология“ е прехвърлена в П.Н. 7.1. Медицина (Протокол №8/13.04.2023 г. от заседание на АС на НАОА), съответно е променено професионалното направление на обучение на докторанта. На основание Решение на Факултетния съвет на Факултет „Медицина“, Медицински университет – Плевен, Протокол №32/11.12.2023 г. ас. Илиева е отчислена със Заповед на Ректора № 3730/11.12.2023 г. с право на защита след изпълнени задачи по индивидуалния учебен план и придобити необходими кредити. На 07.03.2025 г. на разширен катедрен съвет е проведена предварителна защита на дисертационния труд на докторанта с решение за откриване на процедура за публична защита на дисертацията.

Представеният ми комплект материали на електронен носител е в съответствие с изискванията на Чл. 38. (1) от Правилник за развитие на академичния състав в Медицински университет – Плевен. Въз основа на набора материали и документи заявявам, че са спазени реда и условията за защита на дисертационен труд за придобиване на ОНС „Доктор“, съгласно ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и ПРАС в Медицински университет – Плевен.

Кратки биографични данни за докторанта

Дисертантът ас. Калина Илиева е бакалавър по „Биология“ и магистър по „Биотехнология“ (2008 г.) от Софийски университет „Св. Климент Охридски“. В периода 2010-2011 г. придобива Level 3 Diploma First line management от Ealing, Hammersmith and West London college. Работи като специалист биолог в Институт по генетика, БАН от 2006 до 2008 г.

От 2012 и понастоящем е член на екипа на сектора по биология като асистент и преподавател в сектора по биология, Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология, Факултет „Медицина“, при Медицински университет – Плевен.

Владее английски и немски език; има високо ниво на компютърна грамотност; притежава умения за изследователска работа с експериментални животни и редица *ex vivo* и *in vitro* тестове.

Дисертационният труд е написан на 146 страници и съдържа 2 таблици, 32 фигури. Включени са всички основни елементи на общо възприетата у нас структурата за представяне на дисертационен труд: въведение – 2 стр.; литературен обзор – 38 стр.; цел и задачи – 1 стр.; материали и методи – 14 стр.; резултати – 42 стр.; обсъждане – 10 стр.; изводи, приноси и приложения – 3 стр.; библиография – 26 стр., включваща 153 източника на латиница, като 33 източника (33.33%) са публикувани след 2020 год.

Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цел и задачи

Всяка година се диагностицират 7.7 милиона нови случая на деменция. Последни тенденции прогнозираят увеличение им в Европа с 87% в периода 2010 – 2050 г. Болестта на Алцхаймер (БА) е най-честата причина за деменция и представлява 60-75% от всички случаи (Ayodele et al. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2021). Освен това, докато смъртността от сърдечни заболявания намалява през последните години, тази, която се дължи на БА, се е увеличила с 68% само през последното десетилетие. Понастоящем няма ефективна терапия на БА и целта на лечението е да подобри, стабилизира или забави когнитивния, функционален и поведенчески дефицит. В терапевтичния подход към БА може да се идентифицират три обстоятелства:

- одобрени лекарства за лечение на заболяването, които включват донанемаб, адуканумаб, донепезил, галантамин, ривастигмин, мемантин и комбинация от мемантин и донепезил;
- терапии в процес на изследване, които работят главно върху амилоид β и тау патологията, и които включват инхибитори на γ -секретаза, инхибитори на β -секретаза, модулатори на α -секретаза, инхибитори на агрегация,

метал-интерфериращи лекарства, лекарства, които подобряват клирънса на амилоид β , инхибитори на иперфосфорилирането на тау протеина, инхибитори на агрегацията на тау протеин и лекарства, които увеличават клирънса на тау;

- други алтернативни терапии, предназначени да подобрят качеството на живота и да допринасят за превенцията на заболяването.

Депресията е много често срещана сред хората с БА, особено в ранните и междинни стадии. Има идентифицирани общи патофизиологични механизми между тези две заболявания, които могат да обяснят прогресията от депресия към БА. Общите молекулярни пътища при развитие на двете патологии, могат да се разглеждат като нови фармакологични таргети за лечението им. Агомелатинът (Ago) е синтетично производно на мелатонина. Той е антидепресант с бързо начало на действие (De Berardis, et al. 2015) и действа като агонист на MT1 и MT2 рецепторите и антагонист на 5-HT_{2C} рецепторите. Оценявам като много актуално и целесъобразно проведеното експериментално проучване с оглед на гореизложеното и на установените противовъзпалителни и невропротективни ефекти на Ago при други модели на невродегенеративни заболявания.

Литературният обзор обхваща 38 страници и съдържа 3 фигури и 2 таблици. Разглеждат се въпроси, свързани с епидемиологията, етиологията и патогенезата на заболяванията, като са представени и рисковите генетични фактори. Значително място е отделено на малатонин и агомелатин, съвременни терапевтични подходи при Алцхаймер асоциирани патологии, невродегенеративни заболявания и депресия, както и на животински модели на БА. Като цяло обзорът е много добре написан, научно издържан и балансиран и показва отлична информираност на докторанта по темата на дисертацията. От него логично е изведено заключението, че изясняването на ефикасността на мелатониновия аналог **агомелатин** върху определени аспекти от патогенезата при модели на БА би допринесло за разширяване на индикациите му и бъдещи клинични проучвания.

Затова и **целта** на дисертацията е формулирана в посока „Да се проучи ефикасността на антидепресанта агомелатин, прилаган по време на ранния и/или на късния етап от прогресията на БА върху патогенезата, индуцирана чрез интрацеребровентрикуларна инфузия на токсини и свързана с

поведенчески, биохимични и клетъчни аномалии при два животински модела на БА“. В изпълнението на тази цел ас. Илиева си поставя следните **6 задачи**: 1. Да се създаде модел на спорадичен Алцхаймер в мъжки плъхове, чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на стрептозотоцин. 2. Да се създаде втори модел на спорадична болест на Алцхаймер, чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на A β 1-42. 3. Да се валидират моделите чрез доказване на когнитивни и поведенчески промени (тестове, отчитащи: памет, тревожност и депресивно-подобно поведение). 4. Да се изследва ефекта на агомелатин върху модел-индуцираните нарушения в нивата на тревожност и безпокойство, паметовите и когнитивни функции. 5. Да се изследват биохимични маркери за невродегенерация и възпаление във фронтална кора и хипокамп при два плъши модела на БА – стрептозотоцинов и амилоиден. 6. Да се направи хистологичен анализ на специфични мозъчни структури (пириформена кора, хипокамп, амигдала) от животни от двата изследвани модела, за оценка на морфологични промени и невронална загуба.

Методика на изследването

Използваните материали и методи са подробно описани в рамките, което позволява да бъдат точно възпроизведени от други изследователи. Прави впечатление прецизността в представянето на информацията в тази част на дисертацията, което подсказва отношение към качеството на получените резултати от докторанта. Използвани са два експериментални модела за предизвикване на спорадична форма на БА – с интрацеребровентрикуларно (icv) въвеждане на стрептозотоцин (STZ) и на Амилоид β 1-42 (A β). При STZ модел Аго се инжектира 30 дни, започвайки 90 дни след токсичния агент. При Експеримент 1 от A β модела, третирането с Аго започва паралелно с icv A β 1-42, а при Експеримент 2 – 30 дни след ифузията на A β 1-42. Животните са изследвани чрез използване на поведенчески тестове, а мозъчни структури от плъхчетата са анализирани чрез хистологичен и биохимичен анализ.

За тестовете на открито поле (OF), повдигнат кръстосан лабиринт (EPM) и радиален осем-раменен лабиринт (RAM) е използвана система за видео проследяване (софтуер SMART PanLab, Harvard Apparatus, САЩ), която анализира събраните данни автоматично. За тестовете светло/тъмно поле (LDT) и за принудително плуване (FST) са направени видеозаписи, които по-

късно са разглеждани от двама независими наблюдатели, които нямат информация за експерименталната група.

Хомогенати от хипокампа и фронталната кора са изследвани с помощта на ELISA за A β , TNF- α , IL-1 β , α -секретаза, β -секретаза и γ -секретаза. Western blot е използван за измерване на тау протеин.

За хистологичен и количествен цитологичен анализ (клетъчна плътност) са използвани препарати, оцветени с хематоксилин и еозин.

Използвани са адекватни статистически методи за обработка и анализ на получените резултати. Избраните, представени и приложени методични подходи са позволили на ас. Илиева да изпълни задачите на изследването и да постигне поставената цел.

Представените резултати от дисертационната работа показват, че проучването е не само добре планирано, но и успешно изпълнено. Данните са описани ясно, добре онагледени. Високо оценявам вида и стила на фигурите с получените резултати, което улеснява ориентирането за модела на БА, както и прецизното описание на фигурите.

При изследването на тревожността и двигателната активност е установено, че хронично третиране с Ago значително подобрява промените в поведението, индуцирани от STZ, като и облекчава предизвиканата от icvA β ₁₋₄₂ повишена тревожност.

При хронично третиране с Ago е настъпило облекчаване на състоянието на анхедония, предизвикано от STZ. Агомелатинът коригира депресивно-подобния отговор при A β -Ago групата в сравнение с A β -veh групата и възстановява афинитета към сладък разтвор, както и коригира депресивно-подобното поведение, предизвикано от инфузията на icvA β ₁₋₄₂, отчетено при тест принудително плуване.

При изследване на хипокамп-зависима пространствена памет чрез радиален осем-раменен лабиринт е доказано, че инфузията на STZ и A β icv значително увреждат пространствената памет, като хроничното третиране с Ago подобрява този показател на животните с STZ модел на БА, но не и при A β модел.

Третирането с Ago понижава нивото на $A\beta_{1-42}$, съпоставимо с контролите и в двете мозъчни структури (фронтална кора и хипокамп), както при стрептозотоцин-индуцирания модел на БА, така и при двата подхода на третиране (експерименти 1 и 2) при амилоиден модел. Ефектите на агомелатин върху нивата на тау-протеин във ФК и хипокампа при стрептозотоциновия модел е несигнификантен, а третирането с Ago намалява отлаганията от хиперфосфорилиран тау-протеин малко по-осезаемо във ФК, сравнено с хипокампа при амилоиден модел на БА.

Приложението на агомелатина върху сигналните маркери на възпалението: $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$ във ФК и хипокамп при STZ модел води до понижаване на стойностите им до нива, съпоставими с шам-контролата. Агомелатинът редуцира повишените нива на γ -секретеза в хипокампа и увеличаване тези на α -секретезата във фронталната кора и хипокампа при амилоидния модел на експериментална БА.

Благоприятно повлияване е отчетено при третирането с агомелатин върху невроналната загуба в различни мозъчни структури при STZ модел и амилоиден модел на БА.

Проучването доказва, че хроничното третиране с Ago положително повлиява нарушенията в поведението, тревожността, когнитивния дефицит, оказвайки невропротективен и противовъзпалителен ефект при два плъши модела на сБА, индуцирани чрез icv инжектиране на STZ или $A\beta$.

Получените резултати са обект на **дискусия** в рамките на 10 страници от дисертацията, където са разгледани и сравнени собствените резултати с данните от други изследвани, което показва развит аналитичен подход у докторанта и добро боравене с научната литература по темата на дисертационния труд. Представено е цялостно, кратко, заключително обсъждане, което обобщава резултатите.

От получените резултати и представеното обсъждане може да се направи извода, че дисертантът владее използваните методи, умело и разбираемо представя получените данни.

Формулирани са седем извода, които са логично отражение на получените резултати. Изводите са точни и изчерпателни, отразяват резултатите по поставените задачи.

Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приемам приносите, формулирани от докторанта. Формулирани са 7 приноса с оригинален характер и 3 с потвърдителен характер. Намирам първия оригинален принос като недостатъчно конкретно формулиран.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 реални статии, на които ас. Илиева е първи автор. Статиите са реферирани и индексирани в световни бази данни, като 2 от тях имат импакт фактор и импакт ранг. Представила е резултатите от изследването на 3 научни форума в България и 1 в чужбина.

Автореферат

Авторефератът е представен на български и английски език. Отговаря на изискванията както по съдържание, така и по оформление. Той отразява коректно същността на дисертационния труд. Онагледен е с високо информативни фигури и таблици. В него са отразени методологията, основните резултати с обсъждането им и съответните изводи, приноси и свързаните с труда публикации и научни съобщения.

Критични забележки и препоръки

Дисертационният труд би спечелил, ако резултатите следват реда на поставените задачи, както и изводите да следват реда на получените резултати. Значителните по обем и резултати хистологични/цитологични изследвания биха могли да бъдат обобщени съответно във формулираните изводи. В книгописа не са дадени източници на кирилица. Има несъвпадение в номерата на страниците в съдържанието и текста. Тези забележки не умаловажават стойността на получените резултати, но това би улеснило четенето на труда

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на ас. Калина Стефчева Илиева „Ефекти на мелатонинергични препарати върху животински модели на невродегенеративни заболявания“ съдържа научно-теоретични и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката. Работата отговаря на всички изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ-Плевен. Представените материали и дисертационни резултати съответстват на специфичните изисквания на висшето училище.

Дисертационният труд показва, че докторантът ас. Калина Илиева е овладяла методики, умее да анализира, да синтезира резултати и да формулира изводи. От изброеното следва, че са изпълнени двете квалификационни задачи на докторантурата – образователната и научната, и завършеният писмен труд може да получи заслужена положителна оценка.

Поради гореизложеното, давам своята **положителна оценка** и **предлагам** на многуоуважаемите членове на Научното жури **да присъди ОНС “Доктор“** на Калина Стефчева Илиева в докторска програма по Медицинска биология, ПН 7.1. Медицина.

17.04.2025 г.
гр. Плевен

Изготвил рецензията: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**
/проф. д-р Галя Ставрева-Маринова, д.м./

TO

The Chairman of the Scientific Jury

under the procedure for the acquisition of ESD "Doctor"

Doctoral program "Medical Biology"

OPINION

by Prof. Galya Tsvetanova Stavreva-Marinova, MD, PhD

Department of Pharmacology and Toxicology

Medical University - Pleven

According to the procedure for awarding the **ESD "Doctor"**

Field of higher education: 7. "Health and sports"

Professional direction: 7.1. "Medicine"

PhD program: "Medical Biology"

Author: Kalina Stefcheva Ilieva

Form of doctoral studies: full-time doctoral student

Dissertation topic: "Effects of melatoninerpic preparations on animal models of neurodegenerative diseases"

Research supervisors: Prof. Milena Atanasova, PhD

Prof. Yana Chekalarova, PhD

I present the opinion in my capacity as a member of the Scientific Jury, as per the Order of the Rector of the MU – Pleven (No. 1024/02.04.2025) and the decision of the 1st absent meeting of the Scientific Jury, held on 08.04.2025. I declare that I have no conflict of interest, including co-authorship with PhD candidate Kalina Ilieva.

General presentation of the procedure

Asst. Prof. Kalina Stefcheva Ilieva has been enrolled as a full-time doctoral student in the doctoral program "Medical Biology", PD 4.3 Biological Sciences, in the Department of "Anatomy, Histology, Cytology and Biology", Faculty of Medicine, at the Medical University - Pleven with Order No. 945/19.05.2020 with scientific supervisors Prof. Milena Atanasova and Prof. Yana Chekalarova and the topic of the

dissertation work "Effects of melatoninergic preparations on animal models of neurodegenerative diseases". She successfully passed the doctoral minimum exam in the specialty on 09.12.2022. After receiving accreditation and changing the professional direction, the doctoral program "Medical Biology" was transferred to PD 7.1. Medicine (No. 8/13.04.2023 of the meeting of the National Evaluation and Accreditation Agency), the professional direction of study of the doctoral student has been changed accordingly. Based on the Decision of the Faculty Council of the Faculty of Medicine, Medical University - Pleven (No. 32/11.12.2023) asst. Ilieva was dismissed by Order of the Rector No. 3730/11.12.2023 with the right to defense after completing tasks under the individual curriculum and acquiring the necessary credits. On 07.03.2025, a preliminary defense of the doctoral student's dissertation was held at an extended departmental council with a decision to open a procedure for public defense of the dissertation.

The set of materials presented to me on electronic media is in accordance with the requirements of Art. 38. (1) of the Regulations for the Development of Academic Staff at the Medical University - Pleven. Based on the set of materials and documents, I declare that the terms and conditions for defending a dissertation for the acquisition of the Doctoral Degree have been complied with, in accordance with the Law on the Defense of Dissertation, the Law on the Defense of Dissertation and the Law on the Defense of Dissertation at the Medical University - Pleven.

Education and qualification

The PhD student, The dissertation assistant Kalina Ilieva holds a Bachelor's degree in Biology and a Master's degree in Biotechnology (2008) from Sofia University "St. Kliment Ohridski". In the period 2010-2011 she acquired Level 3 Diploma First line management from Ealing, Hammersmith and West London college. She worked as a specialist biologist at the Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences from 2006 to 2008.

From 2012 to the present she is a member of the team of the biology sector as an assistant and lecturer in the biology sector, Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Faculty of Medicine, at the Medical University - Pleven.

She is fluent in English and German; has a high level of computer literacy; has skills for research work with experimental animals and a number of ex vivo and in vitro tests.

The dissertation is written on 146 pages and contains 2 tables and 32 figures. All the main elements of the generally accepted in our country structure for presenting a dissertation work are included: introduction – 2 pages; literature review – 38 pages; purpose and tasks - 1 page; materials and methods – 14 pages; results – 42 pages; discussion – 10 pages; conclusions and contributions 3- pages; bibliography - 26 pages, including 153 sources in Latin; with 33,33% of articles published after 2020.

Relevance of the topic and appropriateness of the set goals and tasks

Each year, 7.7 million new cases of dementia are diagnosed. Recent trends predict an 87% increase in the number of cases in Europe between 2010 and 2050. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, accounting for 60-75% of all cases (Ayodele et al. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2021). Furthermore, while mortality from heart disease has decreased in recent years, mortality from AD has increased by 68% in the last decade alone. There is currently no effective treatment for AD and the aim of treatment is to improve, stabilise or slow cognitive, functional and behavioural deficits. Three circumstances can be identified in the therapeutic approach to AD:

- approved drugs for the treatment of the disease, which include donanumab, aducanumab, donepezil, galantamine, rivastigmine, memantine and a combination of memantine and donepezil;
- investigational therapies that target mainly amyloid β and tau pathology, and which include γ -secretase inhibitors, β -secretase inhibitors, α -secretase modulators, aggregation inhibitors, metal-interfering drugs, drugs that improve amyloid β clearance, tau hyperphosphorylation inhibitors, tau aggregation inhibitors, and drugs that increase tau clearance;
- other alternative therapies designed to improve quality of life and contribute to disease prevention.

Depression is very common among people with AD, especially in the early and intermediate stages. Common pathophysiological mechanisms have been identified between these two diseases that may explain the progression from depression to AD. The common molecular pathways in the development of both pathologies may be considered as novel pharmacological targets for their treatment. Agomelatine (Ago) is a synthetic derivative of melatonin. It is an antidepressant with a rapid onset of action

(De Berardis, et al. 2015) and acts as an agonist of MT1 and MT2 receptors and an antagonist of 5-HT_{2C} receptors. I consider the conducted experimental study to be very relevant and appropriate in view of the above and the established anti-inflammatory and neuroprotective effects of Ago in other models of neurodegenerative diseases.

The **literature review** covers 38 pages and contains 3 figures and 2 tables. Issues related to the epidemiology, etiology and pathogenesis of the diseases are considered, and genetic risk factors are also presented. A significant place is devoted to melatonin and **agomelatine**, modern therapeutic approaches in Alzheimer's-associated pathologies, neurodegenerative diseases and depression, as well as animal models of AD. Overall, the review is very well written, scientifically sound and balanced and shows excellent awareness of the doctoral student on the topic of the dissertation. It is logical to conclude that clarifying the efficacy of the melatonin analogue agomelatine on certain aspects of the pathogenesis in AD models would contribute to expanding its indications and future clinical studies.

Therefore, the **aim** of the dissertation is formulated in the direction of "To study the efficacy of the antidepressant agomelatine, administered during the early and/or late stage of AD progression, on the pathogenesis induced by intracerebroventricular infusion of toxins and associated with behavioral, biochemical and cellular abnormalities in two animal models of AD". In the implementation of this aim, Asst. Prof. Ilieva sets herself the following **6 tasks**: 1. To create a model of sporadic Alzheimer's in male rats, by intracerebroventricular injection of streptozotocin. 2. To create a second model of sporadic Alzheimer's disease, by intracerebroventricular injection of A β 1-42. 3. To validate the models by demonstrating cognitive and behavioral changes (tests measuring: memory, anxiety and depressive-like behavior). 4. To investigate the effect of agomelatine on model-induced impairments in memory and cognitive functions and depressive behavior. 5. To investigate biochemical markers of neurodegeneration and inflammation in the frontal cortex and hippocampus in two rat models of AD – streptozotocin and amyloid. 6. To perform histological analysis of specific brain structures (piriform cortex, hippocampus, amygdala) from animals from the two studied models, to assess morphological changes and neuronal loss.

Research methodology

The materials and methods used are described in detail within the framework, which allows them to be accurately reproduced by other researchers. The precision in the presentation of information in this part of the dissertation is impressive, which suggests an attitude towards the quality of the results obtained by the doctoral student. Two experimental models for inducing AD were used - with intracerebroventricular (icv) administration of streptozotocin (STZ) and Amyloid β 1-42 ($A\beta$). In the STZ model, Ago was injected for 30 days, starting 90 days after the toxic agent. In Experiment 1 of the $A\beta$ model, treatment with Ago began in parallel with icv $A\beta$ 1-42, and in Experiment 2 - 30 days after the infusion of $A\beta$ 1-42. The animals were studied using behavioral tests, and brain structures from the rats were analyzed by histological and biochemical analysis.

For the open field (OF), elevated plus maze (EPM) and radial eight-arm maze (RAM) tests, a video tracking system (SMART PanLab software, Harvard Apparatus, USA) was used, which analyzed the collected data automatically. For the light/dark field (LDT) and forced swim (FST) tests, video recordings were made and later reviewed by two independent observers who had no information about the experimental group.

Homogenates from the hippocampus and frontal cortex were examined using ELISA for $A\beta$, TNF- α , IL-1 β , α -secretase, β -secretase and γ -secretase. Western blot was used to measure tau protein.

For histological and quantitative cytological analysis (cell density), preparations stained with hematoxylin and eosin were used.

Adequate statistical methods were used to process and analyse the obtained results. The selected, presented and applied methodological approaches allowed Asst. Ilieva to fulfill the tasks of the study and achieve the set goal.

The presented results of the dissertation show that the study was not only well planned, but also successfully implemented. The data are described clearly, well illustrated. I highly appreciate the type and style of the figures with the obtained results, which facilitates orientation for the AD model, as well as the precise description of the figures.

In the study of anxiety and motor activity, it was found that chronic treatment with Ago significantly improves the behavioral changes induced by STZ, and also alleviates the increased anxiety caused by icvA β 1-42.

With chronic treatment with Ago, there was relief of the state of anhedonia induced by STZ. Agomelatine corrected the depressive-like response in the A β -Ago group compared to the A β -veh group and restored the affinity for a sweet solution, as well as corrected the depressive-like behavior induced by the infusion of icvA β 1–42, reported in the forced swim test.

In a study of hippocampal-dependent spatial memory using a radial eight-arm maze, it was demonstrated that infusion of STZ and A β icv significantly impaired spatial memory, with chronic treatment with Ago improving this parameter in animals with the STZ model of AD, but not in the A β model.

Treatment with Ago reduced the level of A β 1-42, comparable to controls, in both brain structures (frontal cortex and hippocampus), both in the streptozotocin-induced AD model and in both treatment approaches (experiments 1 and 2) in the amyloid model. The effects of agomelatine on tau protein levels in the FC and hippocampus in the streptozotocin model were insignificant, and treatment with Ago reduced hyperphosphorylated tau protein deposits slightly more significantly in the FC compared to the hippocampus in the amyloid model of AD.

The application of agomelatine on the signaling markers of inflammation: TNF- α and IL-1 β in the FC and hippocampus in the STZ model leads to a decrease in their values to levels comparable to the sham control. Agomelatine reduces the increased levels of γ -secretase in the hippocampus and increases those of α -secretase in the frontal cortex and hippocampus in the amyloid model of experimental AD.

A beneficial effect has been reported in the treatment with agomelatine on neuronal loss in various brain structures in the STZ model and the amyloid model of AD.

The study proves that chronic treatment with Ago positively affects behavioral disorders, anxiety, cognitive deficit, exerting a neuroprotective and anti-inflammatory effect in two rat models of AD, induced by icv injection of STZ or A β .

The obtained results are the subject of **discussion** within 10 pages of the dissertation, where the own results are examined and compared with the data from other studies, which shows a developed analytical approach in the doctoral student

and a good handling of the scientific literature on the topic of the dissertation work. A comprehensive, brief, concluding discussion is presented, which summarizes the results.

From the obtained results and the presented discussion, it can be concluded that the dissertation student masters the methods used, skillfully and understandably presents the obtained data.

Seven conclusions have been formulated, which are a logical reflection of the obtained results. The conclusions are accurate and comprehensive, reflecting the results of the tasks set.

Contributions and significance of the work for science and practice

I accept the contributions formulated by the PhD student. 7 contributions of an original nature and 3 of a confirmatory nature have been formulated. I find the first original contribution to be insufficiently specifically formulated.

Assessment of dissertation publications

The results have been published in 3 real articles, of which Asst. Prof. Ilieva is the first author. The articles are referenced and indexed in global databases, with 2 of them having an impact factor and impact rank. She has presented the results of the study at 3 scientific forums in Bulgaria and 1 abroad.

Abstract of the doctoral thesis

The abstract is presented in Bulgarian and English. It meets the requirements in terms of both content and layout. It correctly reflects the essence of the dissertation work. It is illustrated with highly informative figures and tables. It reflects the methodology, the main results with their discussion and the relevant conclusions, contributions and related publications and participation in scientific forums.

Critical remarks and recommendations

The dissertation would benefit if the results followed the order of the tasks set, as well as the conclusions followed the order of the obtained results. The significant in volume and results histological/cytological studies could be summarized accordingly in the formulated conclusions. The bibliography does not give sources in Cyrillic.

There is a discrepancy in the page numbers in the content and text. These remarks do not diminish the value of the obtained results, but this would make the work easier to read

CONCLUSION

The dissertation of Asst. Prof. Kalina Stefcheva Ilieva "Effects of melatoninerpic preparations on animal models of neurodegenerative diseases" contains scientific-theoretical and scientific-applied results that represent an original contribution to science. The work meets all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its Implementation, and the relevant Regulations of the MU – Pleven. The presented materials and dissertation results fully correspond to the specific requirements of the university.

The dissertation work shows that the doctoral student Asst. Kalina Ilieva has bibliographic culture at a scientific level, has mastered methodologies, is able to analyze, synthesize results and formulate conclusions. From the above, it follows that the two qualification tasks of the doctoral program – educational and scientific – have been fulfilled, and the completed written work can receive a well-deserved positive assessment.

Due to the above, I give my positive assessment and propose to the esteemed members of the Scientific Jury to award the ESD "Doctor" to Kalina Stefcheva Ilieva in the doctoral program in Medical Biology, Professional direction 7.1. Medicine.

18.04.2025

Pleven

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

/Prof. Galya Stavreva-Marinova, MD, PhD/