

СТАНОВИЩЕ

от проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн
професор по Молекулярна биология

Катедра “Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“, МФ,
Тракийски Университет – Стара Загора

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор”
Област на висше образование 7.0 Здравеопазване и спорт, Професионално направление
7.1 Медицина
Докторска програма: “Медицинска биология”

Автор: Калина Стефчева Илиева

Катедра: “Анатомия, хистология, цитология и биология”, Медицински факултет,
МУ- Плевен

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

Форма на докторантурата: редовен докторант

Научен ръководител: проф. Милена Атанасова Атанасова- Радева, д.б.
проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова, д.м.

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие със Закона за развитие на академичния състав /ЗРАСРБ/, Правилника за прилагането му и Правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен, включва изискваните документи и потвърждава законността на процедурата.

Докторантът Калина Стефчева Илиева е родена на 09.04.1983г. Завършила е висшето си образование в БФ на СУ “Климент Охридски” със степен бакалавър по Биология, последвана от Магистър по биотехнология през 2008г. Същата година постъпва като биолог-специалист в Института по генетика на БАН.

От 2012г. е асистент в сектор Биология на Катедрата по Анатомия, хистология, цитология и биология, Медицински факултет, МУ- Плевен, където работи

понастоящем. От 2020 е редовен докторант към същата Катедра по докторска програма “Медицинска биология”. Отчислен е на 11.12. 2023г. с право на защита. Направената справка в Scopus показва 7 публикации с участие на докторанта в списания с Импакт фактор и Импакт ранг, H-index 4 и 65 цитирания в SCOPUS и Web of Science.

2. Актуалност на тематиката

Представеният ми за становище дисертационен труд е посветен на изследване ефекта на антидепресанта агомелатин (Ago) върху поведенчески, хистологични и молекулни аномалии при два животински модела на болестта на Алцхаймер (БА).

Болестта на Алцхаймер е най-често срещаната форма от невродегенеративните заболявания, особено сред възрастното население над 65-70г. Въпреки че е известно от доста отдавна и до днес няма ефективни средства за неговата профилактика и лечение, а само частичен контрол на част от характерните клинични симптоми. През последните десетилетия са проучени голяма част от молекулните и клетъчни механизми, водещи до невронална загуба при това прогресивно невродегенеративно заболяване, последвана от тежки когнитивни промени, водещи до пълна инвалидизация на индивида. Животинските модели на БА са един от инструментите за изучаване на механизмите на заболяването, както и тестване на нови терапевтични средства. В този смисъл, избраната от докторанта и неговите научни ръководители тематика на дисертационния труд е актуална от научна гледна точка и полезна за клиничната практика с оглед установяване на ефектите от приложението на синтетичният антидепресант агомелатин, прилаган по време на ранния и/или на късния етап от прогресията на БА върху патогенетичните промени, индуцирана чрез интрацеребровентрикуларна инфузия на стрептозотозин или бета амилоид (A β 1-42) и свързана с поведенчески, невронални и молекулни патологии при два животински (плъши) модела на БА.

3. Познаване на проблема

Ас. Калина Илиева показва задълбочено познаване на разглежданата проблематика в различните и аспекти. Литературният обзор е написан компетентно и показва добрата теоретична подготовка на докторанта по темата. В него последователно се разглеждат видовете БА (спорадична и фамилна), стadiите в развитието на болестта, хистопатологичните промени в мозъчните структури, биомаркери за диагностика, съвременните фармацевтични подходи спрямо Алцхаймер асоциираните патологии, както и животинските модели използвани при изучаването на механизмите и подходите на терапия при това заболяване. Акцентуирано е на депресивните състояния при БА и

възможностите за тяхното повлияване. Разгледани са по-подробно мелатонинергичните антидепресанти, като мелатонин и агомелатин. Агомелатинът е синтетично производно на мелатонина, удобен за употреба като антидепресант в Европа и Австралия, но не и в САЩ. Неговият фармакологичен механизъм на действие се опосредства от факта, че е агонист на MT1 и MT2 рецепторите и антагонист на 5-HT2C рецепторите.

4. Методика на изследването

Основните експериментални методи в този дисертационен труд са две групи – създаване на експериментални модели и съответните анализи за оценка на промените в тези модели. Използвани са два модела на спорадичен Алцхаймер, създавани чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на стрептозотоцин или A β 1-42 в мъжки плъхове от две породи. Част от експерименталните животни са третирани с Ago. Нивата на тревожност и безпокойство, както и когнитивните функции са оценявани посредством поведенчески тестове като: „Открито поле“, „Повдигнат кръстосан лабиринт“, „Светло-тъмно поле“, осем-раменен радиален лабиринт, тест за изследване на предпочитание към сладки разтвори и тест за принудително плуване. Освен това са измервани количествата на проинфламаторните цитокини - TNF- α и IL-1 β , както и протеините - A β , α -секретаза, β -секретаза и γ -секретаза чрез ELISA тестове, докато фосфорилираната форма на тау протеина е определяна чрез Western blot.

Количественият анализ на клетъчната плътност е осъществен чрез определяне на броя на оцветените клетки в хистологични препарати от избраните мозъчни структури.

За оценка и интерпретация на резултатите са приложени подходящи и съвременни статистически методи. В заключение работата е методично богата и използваните методи и анализи позволяват постигането на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е представен на 146 страници, структуриран съобразно изискванията и съдържа въведение (2стр.), литературен обзор (40стр.), цел и задачи (1), материал и методи (12), резултати (43), обсъждане (10), изводи (1) и библиография. Представени са също приносите, публикациите и участията в научни прояви. Използвани са 167 литературни източника, всички от които на латиница. За онагледяване на резултатите са приложени 2 таблици и 31 фигури.

Въведението резюмира актуалността на изследванията, касаещи диагностиката, изучаването на патогенезата и възможностите за терапевтични подходи при Болестта

на Алцхаймер и обосновава целта на изследванията в дисертационния труд. Литературният обзор е задълбочен и построен целенасочено. Целта и задачите са ясно формулирани в съответствие с темата на дисертацията и представения литературен обзор. Резултатите са представени изчерпателно и са добре онагледени. Установено е че използваните животински модели развиват признаци, характерни за спорадичен Алцхаймер чрез приложените поведенческите тестове и анализирани молекулни маркери. Повишена експресия на $A\beta$ и фосфорилиран тау-протеин е установен във фронтална кора и хипокампа три месеца след инфузията на стрептозотоцина и два месеца след инфузията на $A\beta_{1-42}$. Най-важният резултат касае ефекта на агомелатина върху проследяваните признаци и маркери в експерименталните модели. Установено е облекчаването на когнитивните и поведенческите нарушения и при двата модела на БА, след прилагането на Аго по време на ранния и на късния стадий на прогресия. Резултатите показват, че Аго в използваната концентрация, облекчава натрупването на $A\beta$ и намалява нивата на $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ и тау протеин във фронтална кора и хипокамп при стрептозотоциновия модел. Пониженото натрупване на амилоидни плаки се свързва с понижената експресия на γ -секретаза и увеличената експресия на α -секретазата в хипокампа, което повлиява метаболизма на $A\beta$ в по-голяма степен към не амилоидогенния път. Аго не оказва ефект на невронална загуба в дорзалния хипокамп и показва слаба невропротекция, вероятно чрез синаптично ремоделиране.

По отношение на дискусията, считам че можеше да бъде по-обстойна, особено при анализа на резултатите от прилаганият антидепресант агомелатин. В предвид високата концентрация, използвана в експериментите и установените странични ефекти на този препарат, особено неговата хепатотоксичност, би трябвало авторът да обсъди лимитиращите фактори на това изследване, особено относно прилагането при човек.

Направените 7 извода отговарят на поставените цел и задачи на дисертационния труд. Те са обосновани, логично формулирани и обобщават адекватно получените резултати. Относно приносите, посочени от автора - 7 с оригинален характер и 3 с потвърдителен характер, считам че оригиналните приноси биха могли да се формулират по-стегнато, а не да повтарят в голяма степен изводите.

6. Преценка на наукометричните критерии и личния принос на докторанта

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 публикации в научни списания и 4 научни съобщения. Две от публикациите в пълен текст са в списания индексирани в базата данни Scopus и Web of Science и ранкирани с Q2. Тези статии са цитирани

общо 22 пъти, което е показател за тяхната научна стойност. Докторската дисертация е реализирана чрез два научни проекта.

Без съмнение е личното участие на докторанта в изпълнението на експериментите и проведените тестове и анализи, както личи от публикациите.

7. Автореферат

Авторефератът е представен на 58 стр., съдържа съществените моменти от пълното издание на дисертационния труд и е съобразен с изискванията за изготвянето му.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Запознавайки се внимателно с представената ми документация за професионалното и научно развитие на докторанта Калина Илиева и след аналитичен и цялостен преглед на дисертационния труд на тема ” Ефекти на мелатонинергични препарати върху животински модели на невродегенеративни заболявания”, считам, че той съдържа оригинални резултати и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане му и Правилника на Медицински Университет - Плевен за присъждане на образователна и научна степен „доктор“. Въз основа на гореизложеното убедено давам **положителна оценка** на представения ми за становище дисертационен труд и предлагам на почитаемото научно жури да присъди **образователната и научна степен „доктор“** на Калина Стефчева Илиева в докторска програма по „Медицинска биология“.

29.04.2025

На основание чл. 59 от ЗЗЛД
.....

проф. Спаска Ангелова Станилова, д.б.н.

ACADEMIC STATEMENT

by Prof. Spaska Angelova Stanilova, PhD, D.Sc.

professor of Molecular Biology

Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics", MF, Trakia
University - Stara Zagora

of a dissertation for the award of an educational and scientific degree "**doctor**"

Field of Higher education 7.0 Health and Sports, Professional Field 7.1 Medicine

Doctoral Program: "Medical Biology"

Author: Kalina Stefcheva Ilieva

Department: "Anatomy, histology, cytology and biology " at the Medical Faculty, Medical
University – Pleven

Theme: "Effects of melatoninerbic medicaments on animal models of neurodegenerative
diseases"

Form of doctoral study: PhD student in full-time education

Scientific supervisor: Prof. Milena Atanasova Atanasova- Radeva, Ph.D.

Prof. Dr. Yana Dimitrova Chekalarova, Ph.D.

1. General presentation of the procedure and the PhD student

The presented set of materials on electronic media is in accordance with the Law on the Development of Academic Staff /ZRASRB/, the Regulations for its implementation and the Regulations on the terms and procedure for acquiring scientific degrees and occupying academic positions at MU-Pleven, including the required documents and confirms the legality of the procedure.

Kalina Stefcheva Ilieva was born on 09.04.1983. She completed her higher education at the Faculty of Biology of Sofia University "Kliment Ohridski" with a Bachelor's degree in Biology, followed by a Master's degree in Biotechnology in 2008. The same year she joined the Institute of Genetics of the Bulgarian Academy of Sciences as a biologist-specialist.

Since 2012. she has been an assistant professor in the Biology sector of the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Faculty of Medicine, MU-Pleven, where she currently works. Since 2020, he has been a full-time doctoral student at the same Department of the doctoral program "Medical Biology". He was discharged on 11.12. 2023 with the right

to defend. The Scopus search shows 7 publications with the participation of the PhD student in journals with Impact Factor and Impact Rank, H-index 4 and 65 citations in SCOPUS and Web of Science.

2. Relevance of the problem

The dissertation work is dedicated to studying the effect of the antidepressant agomelatine (Ago) on behavioral, histological and molecular abnormalities in two animal models of Alzheimer's disease (AD).

Alzheimer's disease is the most common form of neurodegenerative diseases, especially among the elderly population over 65-70 years old. Although it has been known for a long time, to this day there are no effective means for its prevention and treatment, but only partial control of some of the characteristic clinical symptoms. In recent decades, a large part of the molecular and cellular mechanisms leading to neuronal loss in this progressive neurodegenerative disease, followed by severe cognitive changes, leading to complete disability of the individual, have been studied. Animal models of AD are one of the tools for studying the mechanisms of the disease, as well as testing new therapeutic agents. In this sense, the topic of the dissertation chosen by the PhD student and his scientific supervisors is relevant from a scientific point of view and useful for clinical practice in order to establish the effects of the use of the synthetic antidepressant agomelatine, administered during the early and/or late stages of AD progression, on the pathogenetic changes induced by intracerebroventricular infusion of streptozotocin or beta amyloid (A β 1-42) and associated with behavioral, molecular and neuronal abnormalities in two animal (rat) models of AD.

3. Knowledge of the problem

Assistant Prof. Kalina Ilieva shows a thorough knowledge of the issue under consideration in its various aspects. The literature review is written competently and shows the good theoretical preparation of the doctoral thesis on the topic. It consistently examines the types of AD (sporadic and familial), the stages in the development of the disease, histopathological changes in brain structures, biomarkers for diagnosis, modern pharmaceutical approaches to Alzheimer's-associated pathologies, as well as animal models used in the study of the mechanisms and approaches to therapy in this disease. The emphasis is on depressive states in AD and the possibilities for influencing them. Melatonergic antidepressants, such as melatonin and agomelatine, are examined in more detail. Agomelatine is a synthetic derivative of melatonin, approved for use as an antidepressant in Europe and Australia, but

not in the USA. Its pharmacological mechanism of action is mediated by the fact that it is an agonist of MT1 and MT2 receptors and an antagonist of 5-HT_{2C} receptors.

4. Research methodology

The main experimental methods in this dissertation work are two groups – use of experimental animal models and the corresponding analyses to evaluate the changes in these models. Two animal models of sporadic Alzheimer's were used, prepared by intracerebroventricular injection of streptozotocin or A β 1-42 in male rats of two breeds. Part of the experimental animals were treated with Ago. The levels of anxiety and restlessness, as well as cognitive functions were assessed by means of behavioral tests such as: "Open field", "Elevated plus maze", "Light-dark field", eight-arm radial maze, test for studying preference for sweet solutions and forced swimming test. In addition, the amounts of proinflammatory cytokines - TNF- α and IL-1 β , as well as the proteins - A β , α -secretase, β -secretase and γ -secretase were measured by ELISA tests, while the phosphorylated form of the tau protein was determined by Western blot. The quantitative analysis of cell density was carried out by determining the number of stained cells in histological preparations from the selected brain structures. Appropriate statistical methods were applied for the evaluation and interpretation of the results. In conclusion, the work is methodically rich and the methods and analyses used allow achieving the set goal and obtaining an adequate answer to the tasks solved in the dissertation work

5. Characteristics and evaluation of the thesis

The dissertation is presented on 146 pages, structured according to the requirements and contains an introduction (2 pages), a literature review (40), a goal and objectives (1), material and methods (12), results (43), discussion (11), conclusions and bibliography. Contributions, publications and participation in scientific events are also presented. 167 literary sources were used, all of which are in Latin. 2 tables and 31 figures are attached to illustrate the results.

The introduction summarizes the relevance of research concerning diagnostics, the study of pathogenesis and the possibilities for therapeutic approaches in Alzheimer's disease and justifies the purpose of the research in the dissertation. The literature review is in-depth and purposefully constructed. The goal and objectives are clearly formulated in accordance with the topic of the dissertation and the presented literature review. The results are presented comprehensively and are well illustrated. It was found that the animal models used developed signs characteristic of sporadic Alzheimer's disease through the applied behavioral tests and analyzed molecular markers. Increased expression of A β and phosphorylated tau protein was

found in the frontal cortex and hippocampus three months after the infusion of streptozotocin and two months after the infusion of A β 1-42. The most important result concerns the effect of agomelatine on the monitored signs and markers in the experimental models. The alleviation of cognitive and behavioral disorders in both models of AD was found after the administration of Ago during the early and late stages of progression. The results show that Ago at the used concentration, but regardless of the route of administration, alleviates the accumulation of A β and reduces the levels of TNF- α , IL-1 β and tau protein in the frontal cortex and hippocampus in the streptozotocin model. The reduced accumulation of amyloid plaques is associated with the reduced expression of γ -secretase and the increased expression of α -secretase in the hippocampus, which influences the metabolism of A β to a greater extent towards the non-amyloidogenic pathway. Ago had no effect on neuronal loss in the dorsal hippocampus and showed weak neuroprotection, probably through synaptic remodeling.

Regarding the discussion, I believe that it could have been more extensive, especially in the analysis of the results of the antidepressant agomelatine used. Given the high concentration applied in the experiments and the well established side effects of this drug, especially its hepatotoxicity, the author should have discussed the limiting factors of this study, especially regarding its application to humans.

The 7 conclusions made correspond to the set goals and objectives of the dissertation work. They are justified, logically formulated and adequately summarize the results obtained. Regarding the contributions indicated by the author - 7 of an original nature and 3 of a confirmatory nature, I believe that the original contributions could have been formulated more concisely, and not to largely repeat the conclusions.

6. Assessment of the scientometric criteria and the personal contribution of the PhD student.

In connection with the dissertation work, 3 publications in scientific journals and 4 scientific communications have been presented. Two of the full-text publications are in journals indexed in the Scopus and Web of Science databases and ranked with Q2. These articles have been cited a total of 22 times, which is an indicator of their scientific value. The doctoral dissertation was realized through two scientific projects.

There is no doubt that the doctoral student personally participated in the implementation of the experiments and the tests and analyses carried out, as is evident from the publications.

7. The Abstract

The abstract is presented on 59 pages, contains the essential moments of the complete edition of the dissertation work and complies with the requirements for its preparation.

CONCLUSION

Having carefully reviewed the submitted documentation about the professional and scientific development of PhD student Kalina Ilieva and after an analytical and comprehensive review of the dissertation on the topic "Effects of melatoninerbic medicaments on animal models of neurodegenerative diseases", I believe that it contains original results and meets all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, its Implementing Regulations and the Regulations of the Medical University - Pleven for the Award of the Educational and Scientific Degree "Doctor". Based on the above, I confidently give a **positive assessment** of the dissertation submitted to me for opinion and propose to the esteemed scientific jury to award the educational and scientific degree "Doctor" to Kalina Stefcheva Ilieva in the doctoral program in "Medical Biology".

29.04.2025

На основание чл. 59 от ЗЗЛД
.....

Prof. Spaska Stanilova, PhD, D.Sc.