

## РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова  
Направление „Поведенческа Невробиология  
Институт по невробиология - БАН

Член на Научно жури, избрано съгласно решение на НС към ИНБ-БАН /протокол №2 21.03.2023 г./ и Заповед на Директора на ИНБ-БАН № 37/26.04.2023 г.

**ТЕМА:** РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА АЛЦХАЙМЕР

**Докторант:** д-р Христина Цанкова Ангелова

**Професионално направление:** 7.1. Медицина

**Докторска програма:** Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)

**Научни ръководители:** доц. д-р Даниела Пехливанова и проф. д-р Елена Джамбазова

### 1. Кратки биографични данни за докторанта.

Христина Цанкова Ангелова завършва магистърска степен по медицина към Медицински университет (МУ) – Плевен, Медицински факултет през 2001 г. През декември 2019 г. придобива специалност по обща хирургия след проведена специализация към ВМИ София. През октомври 2016 г. спечелва конкурс за задочна докторантура и е зачислена за докторант към ИНБ-БАН, Направление „Поведенческа невробиология“. Има натрупан трудов стаж, включително като лекар ординатор към 1ва МБАЛ-София в отделение по обща и коремна хирургия, работи като лекар /2018 г/ в Клиника за лазерна медицина, асистент-преподавател към катедра „Анатомия, патоанатомия и съдебна медицина“ към МФ на СУ „Св.Климент Охридски“. Към момента изпълнява длъжността медицински директор на клинични изпитания към R&D Services.

### 2. Актуалност и трансланционна значимост на тематиката.

Болестта на Алцхаймер (AD) е прогресивно невродегенеративно заболяване засягащо най-вече възрастните хора и изразяващо се с трайна загуба на паметта и когнитивни нарушения водещи до неадекватност и поведенчески промени на пациентите. Наблюдаваните неврофибриларни сплитания (NFT) и ектстрацелуларни сенилни плаки (SP) се общовъзприети биомаркери за диагностициране на заболяването. Подобно на

останалите невродегенеративни заболявания терапевтичните подходи са основно симптоматични и не повлияват прогресията на AD, а спомагат единствено за временно забавяне на влошаващите се когнитивни процеси и памет. В практиката се прилагат най-вече холинестеразни инхибитори или блокери на NMDA, които имат сериозни странични ефекти. Независимо, че финансиранята на научните изследвания върху откриването на ефикасни терапии за AD в САЩ са приоритетни, към настоящия момент все още няма надеждни подходи за превенция или лечение на това невродегенеративно заболяване. В тази връзка, изследванията в настоящия дисертационен труд, насочени към проучване ефектите на екзогенно инжектирания дипептид киоторфин (КТР) върху патологията свързана с поведенчески и хистологични изменения при модел на AD на плъхове имат потенциално предклинично значение за изясняване ролята на този пептид, за който е известно че при заболяването мозъчните му нива са намалени, а фосфолирирания тау-протеин е увеличен.

В контекста на гореспоменатото, считам че тематиката на разработения дисертационен труд е много актуална и получените резултати при експериментален модел на спорадична AD при плъхове би допринесло за по-нататъшно проучване на невропротективната роля на ендогенния невропептид КТР и евентуално ще спомогне за разработването на нови прогностични алгоритми и терапевтични подходи, включително използването на определени биомаркери за оценка на риск от развитие на това заболяване.

### **3. Структура на дисертационния труд.**

Дисертационния труд е представен от докторанта в обем от 101 стандартни страници, следвайки общоприет модел за този вид научни трудове, който съдържа Увод (1 стр.), Литературен обзор (27 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (9 стр.), Резултати (19 стр.), Обсъждане (11 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси и Библиография. Дисертационният труд е онагледен със 7 схеми към Литературния обзор и 26 фигури в Резултати. Списъкът на литературните източници съдържа над 300 цитати. Работата е балансирана и с акцент върху патофизиологията на заболяването, ролята на невропептидите и в частност на ендогенния КТР и съпоставка със собствените резултати с показани ефекти на екзогенно въведения пептид при модела на спорадична AD и съответна интерпретация.

**3.1. Цел и задачи.** Целта на дисертационния труд е свързана с проучване ефектите на многократно ицв прилаган КТР върху нарушенията в когнитивните процеси, ниво на тревожност и хистологични изменения наблюдавани през ранна и късна фаза при

експериментален модел предизвикан с ицв инфузия на стрептозотоцин (STZ) на плъхове. За реализиране на целта са поставени общо три задачи, които са ясно и адекватно формулирани.

**3.2.Методически подходи.** Избрани са подходящи и съобразени с целта и поставените задачи методични подходи, които са прецизно описани. За целите на изследването с прилагане на фармакологичен подход при модел на спорадична AD при плъхове предварително е реализирано доза-зависимо проучване на дипептида върху болковата чувствителност и поведенчески реакции при интактни животни с цел подбор на най-подходящата доза на КТР при модела. За оценка на ефектите на многократна ицв инфузия на дипептида през ранна и късна фаза при STZ-индуциран модел при плъхове са използвани поведенчески тестове за изследване на безпокойство и памет, хистологични и биохимични методи, които са адекватно подбрани. Използвани са мъжки Вистар плъхове, разделени в групи ( $n = 10$ ), съобразно третирането им. Прави добро впечатление подробното описание на всяка процедура в отделните експериментални постановки, въпреки, че обичайно експерименталния дизайн се дава в началото на методите, а не в края както е в дисертационния труд.

**3.3. Резултатите** следват хода на поставените цели и задачи. Те са отлично представени и онагледени с помощта на 26 фигури. Според експерименталния дизайн, описан подробно в Методите, в Експеримент #1 е изследвана доза-зависимост на КТР върху болков праг, двигателна активност, изследователска активност и хабитуация при интактни плъхове. При една от групите с КТР, дипептида е инфузиран в най-висока доза от 100  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$  в продължение на 10 дни. В Експеримент #2 при модела на AD, където имаме всъщност два отделни експеримента т.е. в ранна фаза на AD /един месец след инфузия на STZ/ и в късна фаза на AD е използвана най-високата доза на КТР, която е подбрана на база на резултатите от Експеримент #1 предполагам, но инфузията не е в 10 дни, а общо 14 дни т.е. 7 дни преди STZ и 7 дни след инфузия на STZ.

Прави добро впечатление подробното изследване по минути при теста „Отворено поле“ на отделни параметри в късната фаза, но тези изследвания не са направени през ранната фаза, което затруднява съпоставката.

Подобно на поведенческите изследвания, хистологичните данни за ранна и късна фаза на AD не са съпоставими, тъй-като за ранна фаза е изследвано отлагания бета-амилоид в хипокамп и кръвоносни съдове, а в късна фаза – невронална загуба.

**3.4. Обсъждането** на резултатите е направено съобразно представянето им в отделните подглави на Резултатите. Отлично впечатление прави интерпретацията на собствените данни съобразно наличните в научната литература резултати.

**3.5.Изводи и Приноси.** Систематизирани са общо четири извода във връзка с описаните резултати и три приноса. Съгласна съм с обособените 4 извода. По отношение на приносите считам, че Принос 2 е част от Принос 1 във връзка с установените благоприятни ефекти на многократна инфузия с КТР върху когнитивните процеси при модел на АД. Вместо това към Принос 2 можеше да се изтъкнат ефектите на дипептида върху нарушенията в нивото на безпокойство при третираните със STZ плъхове. Препоръчително е потвърждаващия или оригинален характер на приносите да бъде изтъкнат.

**3.6.Цитираната литература** обхваща над 300 източника (болшинството са на латиница). Повече от 50 % от тях са от последните десет години.

**4.Авторефератът** е изработен изцяло в съответствие със съдържанието на дисертационния труд, представяйки го в съкратен вариант, с включените в него основни глави. За разлика от дисертационния труд, в него е дадена справка за публикациите на докторанта по темата както и списък със забелязаните цитирания и участия в научни форуми.

**5. Публикации по темата на дисертационния труд и личен принос на докторанта.** По темата на дисертационния труд са публикувани общо четири статии – две от тях с ИФ. Три от статиите са с Q2 или Q3. Отлично впечатление прави факта, че и в 4-те статии докторанта е първи автор, което потвърждава личния принос към дисертационния труд. От друга страна, изследванията и изнесените резултати в него са намерили отзвук в научната литература /осем цитата за две от статиите, шест, от които в научни списания и две в други чужди дисертационни трудове/. Цитиранията потвърждават научната стойност на направените изследвания и предполагаемата им транслационна значимост.

Резултатите от дисертационния труд са представени на седем международни и четири национални научни форум, от които на четири докторантът е първи автор. Д-р Христина Ангелова има участия в два научни проекта, които са по тематиката на дисертационния труд.

**6. Критични бележки и препоръки**

**Материали и Методи.** По отношение на хистологичния анализ с Cresyl violet не е уточнена коя част на хипокампа е изследвана: дорзален, вентрален или и двете, което има важно значение с оглед на функционалните им различия и изследванията в дисертационния труд свързани с поведение на безпокойство и памет.

Технически грешки: Методи: Експериментална схема на втора задача: не е отбелязана количеството КТФ в  $\mu\text{g}$  в заглавието.

**Резултати:** В резултатите описващи Експеримент #2 липсва информация какво е основанието да се направи проучването с най-високата доза на КТФ, показала ефекти при теста „Отворено поле“ с намалена двигателна активност /Фиг.4/.

Липсва съответствие между някои от изследваните параметри /и в някои случаи има разминаване в начина им на описване/ при експериментите в ранната и късната фаза, което би спомогнало за по-добра съпоставка на ефектите на КТФ, както и на трайността на модела и тълкуването им. Примерно, изминатото разстояние в см при теста „Отворено поле“ е представен на Фиг. 4 като “trajectory length” /интактни животни/, на Фиг. 6 /ранна фаза AD/ като „total distance traveled”, а на Фиг. 12 /късна фаза на AD/ като “Total ambulation”.

В **Дискусията** е направен коментар, че модела на AD , при който е наблюдавана повишена двигателна активност /хиперактивност/ съпроводена с увеличен престой в аверсивната централна зона представлява „анксиолитичен тип поведение“, който израз намиран за неточен, тъй-като модела води по-скоро до патологични промени в поведението и импулсивен тип поведение /увредена „преценка“ за опасно състояние, която нормално се проявява при интактни мозъчни структури/ вероятно свързан с нарушения в асоциативни невронални връзки между енторинална кора, вентрален хипокамп и амигдала, които структури съвместно определят нивото на страхова реакция при индуцирани ситуации на тревожност.

Въпроси:

Известно е, че късите пептиди /под 6 АК остатъка/ пресичат КМБ и това предполага, че ще имат централни ефекти и при системно инжектиране. Защо е прилагана многократна ицв инфузия /14 дни/ с КТР, която е свързана с процедурни трудности и ежедневен стрес при третиране на животните.

Има ли данни за разпределението на КТР рецептори, за които се споменава в дисертацията, в мозъчни структури имащи отношение към когнитивните процеси?

**Заклучение.**

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е посветен на много актуална тема, а заложените в него цели и задачи са осъществени чрез значителна по обем експериментална работа посредством съвременни методични подходи. Проучванията върху терапевтични подходи за третиране АД-индуцираната патология имат огромно значение с оглед на факта, че това е едно от невродегенеративните заболявания с най-голяма честота и терапията е симптоматична. Положените от докторанта усилия за разработване на тематиката заслужава висока оценка. Следователно, считам, че дисертационния труд на д-р Христина Ангелова е оригинален и отговаря изцяло на Закона за развитие на академичния състав в Република България, правилника за неговото прилагане на ИНБ-БАН за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”.

Поради горе-изложеното давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Уважаемото Научно жури да присъдят на д-р Христина Цанкова Ангелова образователната и научна степен „Доктор” в професионално направление 7.1. Медицина, Научна специалност: Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия).

20.05.2023 г.

Изготвил рецензията:

/проф.д-р Яна Чекаларова/

## PEER REVIEW

From Prof. Jana Tchekalarova  
Head of the Department “Behavioral Neurobiology”  
Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences

Member of the Scientific Jury, according to Decision of the Scientific Board of INB-BAS (protocol No 2 from 21.03. 2023) and Director Order No. 37/26.04.2023

According to the procedure for the defense of the thesis on the topic: “ROLE OF KYOTORPHINE IN THE BEHAVIORAL AND HISTOLOGICAL CHANGES INDUCED IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE”

**Doctoral student:** Dr. Christina Tzankova Angelova

**Doctoral program:** Pharmacology

**Supervisors:** Assoc prof. dr. Daniela Pechlivanova and prof. Elena Djambazova

### 1. Brief biographical data.

Christina Tzankova Angelova holds a master's degree in Medicine from the Medical University-Pleven, Medical Faculty 2001. In December 2019, she acquired a specialty in general surgery after a specialization at the Sofia Medical University. In October 2016, she won a competition for part-time doctoral studies and was enrolled as a doctoral student at the Institute of Biomedical Sciences, Department of Behavioral Neurobiology. She has accumulated work experience, including as a resident doctor at the 1st MBAL-Sofia in the Department of general and abdominal surgery, worked as a doctor /2018/ at the Clinic for Laser Medicine, teaching assistant at the Department of "Anatomy, Pathoanatomy and Forensic Medicine" at the Ministry of Health of SU "St. Kliment Ohridski". Currently serves as Medical Director of Clinical Trials at R&D Services.

### 1. Relevance and translational significance of the topic.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that mainly affects the elderly and manifests itself with permanent memory loss and cognitive disorders leading to inadequacy and behavioral changes in patients. The observed neurofibrillary tangles (NFT) and extracellular senile plaques (SP) are commonly accepted biomarkers for the diagnosis of the disease. Like other neurodegenerative diseases, the therapeutic approaches are mainly symptomatic and do not affect the progression of AD, but only help to temporarily slow down the deteriorating cognitive processes and memory. In practice, mostly cholinesterase inhibitors or NMDA blockers are used, which have serious side effects. Although research funding for the discovery of effective therapies for AD is a priority in the US, there are currently no reliable approaches to prevent or treat this neurodegenerative disease. In this regard, the studies in the present dissertation aimed at investigating the effects of exogenously injected dipeptide kyorthorphan (KTP) on the pathology associated with behavioral and histological changes in a rat model of AD have potential preclinical significance in elucidating the role of this peptide, which is it is known that in the disease its brain levels are reduced and phosphorylated tau protein is increased. In the context of the above, I believe that the subject of the developed dissertation is very relevant and the results obtained in an experimental model of sporadic AD in rats would contribute to further research on the neuroprotective role of the endogenous neuropeptide KTP and possibly help to develop new prognostic algorithms and therapeutic approaches, including the use of certain biomarkers to assess the risk of developing this disease.

### 2. The structure of the dissertation.

The dissertation work is presented by the doctoral student in a volume of 101 standard pages, following a generally accepted model for this type of scientific work, which contains an Introduction (1 page), Literature review (27 pages), Aim and tasks (1 page), Materials and methods (9 pages), Results (19 pages), Discussion (11 pages), Conclusions (1 page), Contributions and Bibliography. The dissertation work is illustrated with 7 diagrams to the Literary Review and 26 figures in the Results. The bibliography contains over 300 citations. The work is balanced and with an emphasis on the pathophysiology of the disease, the role of neuropeptides and in particular the endogenous KTP and a comparison with the own results with shown effects of the exogenously introduced peptide in the model of sporadic AD and corresponding interpretation

**3.1. Aim and tasks.** The aim of the dissertation is related to the study of the effects of repeated icv administration of KTP on disturbances in cognitive processes, level of anxiety and histological changes observed during the early and late phase in an experimental model induced by icv infusion of streptozotocin (STZ) in rats. To realize the goal, a total of three tasks have been set, which are clearly and adequately formulated.

**3.2. Methodical approaches.** Methodical approaches have been chosen that are appropriate and consistent with the goal and tasks, which are precisely described. For the purposes of the study, applying a pharmacological approach in a model of sporadic AD in rats, a dose-dependent study of the dipeptide on pain sensitivity and behavioral responses in intact animals was previously implemented in order to select the most appropriate dose of KTP in the model. To evaluate the effects of repeated iv infusion of the dipeptide during the early and late phases in the STZ-induced rat model, behavioral tests of anxiety and memory, histological and biochemical methods, which were adequately selected, were used. Male Wistar rats were used, divided into groups ( $n = 10$ ) according to their treatment. The detailed description of each procedure in the individual experimental setups makes a good impression, although usually the experimental design is given at the beginning of the methods and not at the end as in the dissertation work.

**3.3. The results** follow the course of the goals and tasks. They are well presented and illustrated with the help of 26 figures. According to the experimental design detailed in Methods, Experiment #1 examined the dose-response of KTP on pain threshold, locomotor activity, exploratory activity, and habituation in intact rats. In one of the CTP groups, the dipeptide was infused at the highest dose of  $100 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  for 10 days. In Experiment #2 in the AD model, where we actually have two separate experiments i.e. in the early phase of AD /one month after STZ infusion/ and in the late phase of AD the highest dose of KTP was used, which was selected based on the results of Experiment #1 I guess. However, the infusion was not at 10 days, but a total of 14 days i.e. 7 days before STZ and 7 days after STZ infusion.

The minute-by-minute study of the Open Field test on individual parameters in the late phase makes a good impression, but these studies were not done in the early phase, making comparison difficult.

Similar to the behavioral studies, the histological data for early and late phase AD are not comparable, as beta-amyloid deposits in the hippocampus and blood vessels were examined for the early phase, and neuronal loss in the late phase.

**3.4. The discussion** of the results is done according to their presentation in the separate sub-chapters of the Results. An excellent impression is made by the interpretation of the own data according to the results available in the scientific literature.

**3.5. Conclusions and Contributions.** A total of four conclusions in relation to the described results and three contributions are systematized. I agree with the 4 specific conclusions. In terms of contributions, I consider Contribution 2 to be part of Contribution 1 in relation to the established beneficial effects of repeated KTP infusion on cognitive processes in an AD model. Instead, the effects of the dipeptide on disturbances in the level of anxiety in STZ-

treated rats could be pointed to Contribution 2. It is recommended that the corroborative or original nature of contributions be highlighted.

**3.6. The cited literature** covers over 300 sources (most are in Latin). More than 50% of them are from the last ten years.

**4. The Autoreferat** is prepared entirely in accordance with the content of the dissertation, presenting it in short version, with the main chapters included in it. Unlike the PhD thesis, it contains a reference to the doctoral student's publications on the topic as well as a list of noted citations and participation in scientific forums.

**5. Publications on the topic of the dissertation work and personal contribution of the doctoral student.** A total of four articles have been published on the subject of the dissertation - two of them with IF. Three of the articles are Q2 or Q3. The fact that in all 4 articles the doctoral student is the first author makes an excellent impression, which confirms the personal contribution to the dissertation work. On the other hand, the research and the results presented in it have found an echo in the scientific literature /eight citations for two of the articles, six of which in scientific journals and two in other foreign dissertation works/. Citations confirm the scientific value of the research done and its presumed translational relevance. The results of the dissertation work have been presented at seven international and four national scientific forums, of which the doctoral student is the first author. Dr. Hristina Angelova has participated in two scientific projects, which are on the subject of the dissertation work.

#### **Critical notes and recommendations.**

**Materials and methods.** Regarding the histological analysis with Cresyl violet, it was not specified which part of the hippocampus was examined: dorsal, ventral, or both, which is important in view of their functional differences and research in the dissertation related to anxiety behavior and memory.

Technical errors: Methods: Experimental scheme of the second task: the amount of CTF in  $\mu\text{g}$  was not noted in the title.

**Results:** In the results describing Experiment #2 information is missing as to why the study was conducted with the highest dose of CTF that showed effects in the Open Field test with reduced locomotor activity /Fig.4/.

There is a lack of correspondence between some of the investigated parameters /and in some cases there is a discrepancy in the way they are described/ in the early and late phase experiments, which would help to better compare the effects of CTF, as well as the durability of the model and their interpretation. For example, the distance traveled in cm in the Open Field test is presented in Fig. 4 as "trajectory length" /intact animals/, in Fig. 6 /early phase AD/ as "total distance traveled", and in Fig. 12 /late phase of AD/ as "Total ambulation".

**In the Discussion,** a comment was made that the model of AD in which increased locomotor activity /hyperactivity/ accompanied by increased residence in the aversive central zone was observed represented an "anxiolytic type of behavior", a term found to be inaccurate, as the model leads rather to pathological changes in behavior and an impulsive type of behavior /impaired "judgment" of a dangerous situation that normally occurs in intact brain structures /possibly related to disturbances in associative neuronal connections between the entorhinal cortex, ventral hippocampus and amygdala, which structures jointly determine the level of fear response in induced anxiety.

Questions:

Short peptides /under 6 AK residues/ are known to cross the BBB and this suggests that they will have central effects also when injected systemically. Why was repeated iv infusion /14 days/ with KTP, which is associated with procedural difficulties and daily stress in handling the animals.

Are there any data on the distribution of KTP receptors mentioned in the dissertation in brain structures related to cognitive processes?

**Conclusion.** The dissertation work presented to me for review is dedicated to a very current topic, and the goals and tasks set in it were realized through extensive experimental work using modern methodological approaches. Studies on therapeutic approaches to treat AD-induced pathology are of great importance in view of the fact that it is one of the neurodegenerative diseases with the greatest frequency and therapy is symptomatic. The efforts made by the doctoral student to develop the topic deserve high praise. Therefore, I consider that the PhD thesis of Dr. Christina Angelova is original and fully complies with the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the regulations for its implementation and the regulations of INB-BAS for awarding the educational and scientific degree "Doctor".

Due to the above, I give my positive assessment and recommend the members of the Honorable Scientific Jury to award Dr. Christina Angelova the educational and scientific degree "Doctor" in professional direction 7.1. Medicine, Doctoral program: Pharmacology.

20.05.2023 г.

Signature.....

(Prof. Dr. Jana Tchekalarova)