

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Албена Георгиева Йорданова, PhD - Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Медицински факултет, Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “ДОКТОР” в професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност Фармакология

**Автор:** Христина Цанкова Ангелова – задочен докторант в Институт по невробиология, БАН

**Тема:** *„Роля на киоторфина в поведенческите и хистологични изменения предизвикани от експериментален модел на болестта на Алцхаймер“*

**Научни ръководители:** *доц. д-р Даниела Пехливанова – ИНБ-БАН и проф. д-р Елена Джамбазова – МФ, СУ ”Св. Климент Охридски”*

В представения ми за становище дисертационен труд на задочния докторант Христина Ангелова е изследван актуален проблем, свързан с установяване ролята на ендогенния дипептид киоторфин в поведенчески и хистологични изменения при прилагане на експериментален модел на болестта на Алцхаймер (чрез интрацеребро-вентрикуларното инжектиране на стрептозотоцин на плъхове). Известно е, че това нелечимо и терминално невродегенеративно заболяване, свързано с прогресивна загуба на паметта, дезориентация, поведенчески проблеми и др. е най-разпространената форма на деменция (около 70 % от случаите на деменция) и обикновено се диагностицира при хора на възраст над 65 години. Развитието на болестта на Алцхаймер условно се разделя на четири фази (преддеменционна фаза, ранна, средна и късна фази), като тежестта на симптомите се засилва и се достига до тежки когнитивни, поведенчески, социални и функционални увреждания. Характерните патоанатомични увреждания при това заболяване са мозъчна атрофия със загуба на неврони, неврофибрилна дегенерация, както и формиране на сенилни и амилоидни плаки. Екстрацелуларните амилоидни плаки се образуват от агрегацията на амилоид бета протеин (A $\beta$ ), в резултат на неправилното разграждане на прекурсорния му протеин (Amyloid Precursor Protein, APP), чрез последователна протеолиза от  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретази. Натрупването на по-плътни плаки от A $\beta$  в хипокампуса, амигдалата и мозъчната кора предизвиква стимулиране на астроцитите и разрастване на микроглията, увреждане на аксони и дендрити и загуба на синапси, което води до необратими фа-

тални изменения в засегнатия организъм. Редица научни изследвания са насочени към търсене на биомаркери за ранната диагностика на заболяването, като е установено понижено ниво на ендогенния дипептид киоторфин и повишено съдържание на фосфорилиран тау-протеин в цереброспинална течност на хора с болестта на Алцхаймер.

Дисертационният труд е добре структуриран, изложението е последователно и логически непротиворечиво и показва подчертания интерес и ангажираност на дисертанта към изследваната проблематика. Дисертацията съдържа 101 стандартни страници и е онагледена с 26 фигури и 7 схеми. Библиографията включва 358 заглавия, от които 5 на кирилица и 358 на английски език. Експериментите са осъществени в Институтите по невробиология и микробиология – БАН, както и в Медицински Университет – София.

В *Литературния обзор* е направен анализ на разглеждания проблем, като в детайли са описани съвременните представи за различните форми на Болестта на Алцхаймер, симптомите и настъпилите мозъчни изменения, ролята на генетичните, епигенетичните и екологичните рискови фактори, както и на съпътстващи заболявания. Представени са подробно и двете основни хипотези за патогенезата на заболяването: хипотезата за амилоидната каскада и хипотезата за хиперфосфорилирането на тау-протеина. Изчерпателно са събрани и описани литературни данни за изолирането и локализацията в мозъка на ендогенния опиоид киотофрин, биосинтезата му в норма и патология, рецепторната сигнализация и инактивация, както и физиологичните ефекти, свързани с участието му при развитието на възпалителни процеси, процесите на хронична болка, както и ролята му в етиологията на болестта на Алцхаймер.

Литературният обзор е изчерпателен и въвежда читателя към изследователската цел, която Христина Ангелова си е поставила: *да се проучи ролята на невропептида киоторфин в развитието на поведенческите и хистологични изменения, предизвикани от инжектиране на стрептозотоцин при плъхове*. Поставените за изпълнение задачи са ясно формулирани в 3 основни направления, включващи: оценка на въздействието на различни дози киоторфин върху болковата чувствителност, параметри на поведение и паметта при здрави плъхове; изследване промените в двигателната и изследователска активност, състоянието на безпокойство в непозната среда, пространствена и работна памет, отлагане на  $\beta$ -амилоид в хипокамп и мозъчни кръвоносни съдове през ранната и късната фази на развитие на заболяването при плъхове третирани с киоторфин или с физиологичен разтвор, спрямо поведението на здрави контролни плъхове.

В раздела *Материали и методи* са описани използваните *in vivo* и *in vitro* методи, статистически анализ на данните и експериментален дизайн.

Получените резултати и дискусия са представени и обсъдени на 29 страници, като всеки от трите раздела на получените резултати съответстват на основните поставени за изпълнение задачи в дисертационния труд. Резултатите са обобщени в 4 извода и 3 научни приноса като основното заключение е, че са установени благоприятни ефекти на дипептида киоторфин върху отклоненията в когнитивното поведение през ранния и късния етапи от развитие на експерименталния модел на болестта на Алцхаймер.

Справката за изпълнение на минималните изисквания по чл. 9, ал. (2) от ЗРАСРБ и приетите от НС на Института по невробиология, БАН минимални изисквания за придобиване на научни степени и академични длъжности показва, че докторант Христина Ангелова надхвърля изискванията, като освен показател А (50 точки за дисертационен труд) тя има 46.1 точки по показател Г (при необходим минимум от 30 точки) от 4 научни публикации в списания с импакт фактор и квартали. Забелязани са 8 цитата на публикациите. Резултатите от дисертационния труд са представени на 10 научни форума у нас или в чужбина.

#### **Имам следните забележки и въпроси към докторантката:**

1. Обемът на дисертационният труд би могъл да бъде по-обширен и да се включат повече цитати от последните години. На стр. 17 и стр. 29 са цитирани нови изследвания, а те са в периода 1995-2007 и 1999-2005 съответно.
2. Защо образуването на карбонилни съединения се изследва в хипокампа и в префронталната кора?
3. Има ли данни и използват ли се в клиничната практика ефективни лекарства на базата на киоторфин за терапия на невродегенеративни заболявания?
4. Известен ли е подобен протективен ефект при прилагане на невротрансмитери (GABA, глутамат и др.) при терапия на невродегенеративни заболявания?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представеният ми за становище дисертационен труд е резултат от комплексни и прецизно осъществени изследвания, като получените резултати имат съществена теоретична и приложна значимост. От извършената и анализирана научно-изследователска работа мога да обобщя, че Христина Цанкова Ангелова е подготвен учен за провеждане на задълбочени научни изследвания, притежаваща необходимите експериментални умения и способности да обсъжда получените авторски резултати и да ги съпоставя с литературни източници. С представените публикации и участия в научни форуми тя отговаря на изискванията в Закона за развитие на

академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на Института по невробиология на БАН.

**Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че дисертационния труд представлява оригинална научна разработка и ми дава основание убедено да препоръчам на дисертантката Христина Цанкова Ангелова да бъде присъдена образователната и научна степен “доктор” в професионално направление 7.1 *Медицина, научна специалност Фармакология.***

10.06.2023 г.

**Изготвил становището:**

/проф. д-р Албена Йорданова/

## OPINION

**From the member of the scientific jury: prof. Albena Georgieva Jordanova,  
PhD - University of Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculty of Medicine,  
Department of Chemistry and Biochemistry, Physiology and Pathophysiology**

For the acquisition of the educational and scientific PhD degree in professional field  
7.1 Medicine, scientific specialty Pharmacology

**Author of the dissertation:** Hristina Tsankova Angelova - PhD student at the Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Science

**Dissertation Topic:** *"Role of Kyotorphin in Behavioral and Histological Changes Induced in an Experimental Model of Alzheimer's Disease"*

**Research supervisors:** *Assoc. Prof. Daniela Pehlivanova - Institute of Neurobiology - BAS and Prof. Dr. Elena Dzhambazova – Faculty of Medicine, University of Sofia "St. Kliment Ohridski"*

In the PhD thesis of Hristina Angelova, submitted for my opinion, a current problem is investigated: establishment of the role of the endogenous dipeptide kyotorphin in behavioral and histological changes when applying an experimental model of Alzheimer's disease (through the intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats). This incurable and terminal neurodegenerative disease is characterized by progressive memory loss, disorientation, behavioral problems, etc. It is the most common form of dementia (about 70% of dementia cases) and is mainly diagnosed in people over the age of 65. The development of Alzheimer's disease is conditionally divided into four phases (pre-dementia phase, early, middle and late phase), with the severity of symptoms increasing and reaching cognitive, behavioral, social and functional impairments. The characteristic pathoanatomical damage in this case occurs with brain atrophy, loss of neurons, neurofibrillary degeneration, as well as the formation of senile and amyloid plaques. The extracellular amyloid plaques are formed by the aggregation of amyloid beta protein (A $\beta$ ), as a result of the incorrect degradation of its precursor protein (Amyloid Precursor Protein, APP), through sequential proteolysis by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. The deposition of denser A $\beta$  plaques in the hippocampus, amygdala, and cerebral cortex induces astrocyte damage and microglial proliferation, axonal and dendritic damage, and synapse loss, leading to irreversible fatal changes in the organism. A number of scientific studies are directed towards the search for biomarkers for the early diagnosis by finding a reduced level of the endogenous dipeptide kyotorphin and an

increased content of phosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of people with Alzheimer's disease.

The PhD thesis is well structured and shows the emphasized interest and commitment of the PhD student Hristina Angelova to the researched topic. The dissertation contains 101 standard pages and is illustrated with 26 figures and 7 schemes. The bibliography includes 358 titles, of which 5 are in Cyrillic and 358 are in English. The experiments were carried out at the Institutes of Neurobiology and Microbiology - BAS, and the Medical University - Sofia.

In the *Introduction part*, an analysis of the problem under consideration is made, describing in details the modern ideas about the various forms of Alzheimer's disease, the symptoms and brain changes that have occurred, the role of genetic, epigenetic and environmental risk factors, as well as concomitant diseases. Both main hypotheses for the pathogenesis of the disease are presented in detail: the amyloid cascade hypothesis and the tau protein hyperphosphorylation hypothesis. Literature data on the isolation and localization in the brain of the endogenous opioid kyotofrin, its biosynthesis in normal and pathological conditions, receptor signaling and inactivation, the physiological effects related to its involvement in the development of inflammatory processes, chronic pain processes, as well as its role in the etiology of Alzheimer's disease have been comprehensively collected and described.

The *Introduction part* introduces to the research goal that Hristina Angelova has set: to study the role of the neuropeptide kyotorphin in the development of behavioral and histological changes induced by streptozotocin injection in rats. The task are clearly formulated in 3 main directions, including: assessment of the effects of different doses of kyotorphin on pain sensitivity, behavioral parameters and memory in healthy rats; examining changes in locomotor and exploratory activity, unfamiliarity anxiety scores, spatial and working memory,  $\beta$ -amyloid deposition in the hippocampus and cerebral blood vessels during early and late development as shown in rats treated with kyotorphin or saline solution, relative to the behavior of healthy control rats.

In the *Materials and Methods* section are described the *in vivo* and *in vitro* methods used, statistical data analysis, and experimental design.

The obtained results and the discussion are presented and discussed in 29 pages and each of the three sections of the obtained results correspond to the main tasks set for implementation in the dissertation. The results are summarized in 4 conclusions and 3 scientific contributions, the main conclusion being that beneficial effects of the dipeptide kyotorphin on the deviations in cognitive behavior during the early and late stages of the development of the experimental model

of Alzheimer's disease were found. According the minimum requirements for acquiring scientific and academic degrees in Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its Implementation and the Regulations for the Development of the Academic Staff of the Institute of Neurobiology, BAS, PhD student Hristina Tsankova exceeds the requirements needed. In addition to indicator A (50 points for dissertation) she has 46.1 points according indicator D (with a required minimum of 30 points) from 4 scientific publications in the scientific journals with impact factor and quartiles. Until now 8 citations to the publications were noted. The results of the dissertation have been presented at 10 scientific forums.

**I have some following remarks and questions for the PhD student:**

1. The dissertation could be more extensive and include more citations from recent years. New studies are cited on page 17 and page 29, and they are from the period 1995-2007 and 1999-2005, respectively.
2. Why is the formation of carbonyl compounds studied in the hippocampus and in the frontal cortex?
3. Are there data and are effective kyotorphin-based drugs used in clinical practice for the therapy of neurodegenerative diseases?
4. Is a similar protective effect known when applying neurotransmitters (GABA, glutamate, etc.) in the therapy of neurodegenerative diseases?

## **CONCLUSION**

The dissertation presented to me for opinion is the result of complex and precisely carried out research, and the obtained results have significant theoretical and applied significance. From the research work carried out and analyzed, I can summarize that Hristina Tsankova Angelova is a fully prepared scientist for conducting in-depth scientific research, possessing the necessary experimental skills and abilities to discuss the obtained author's results and compare them with literary sources. With the presented publications and participation in scientific forums, she meets the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its Implementation and the Regulations for the Development of the Academic Staff of the Institute of Neurobiology, BAS.

**Based on the above, I can confidently state that the PhD thesis represents an original scientific development and gives me reason to confidently recommend that the PhD**

**student Hristina Tsankova Angelova be awarded the educational and scientific PhD degree in professional field 7.1 *Medicine*, scientific specialty *Pharmacology*.**

10.06.2023

Author of opinion:

/prof. Albena Jordanova, PhD/