

СТ А Н О В И Щ Е

От проф. д-р Росица Замфирова, ИНБ, БАН

Относно дисертационен труд насочен за публична защита за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 7.1. Медицина Научна специалност “Фармакология” към направление „Поведенческа невробиология“ на ИНБ-БАН

на задочен докторант Д-Р ХРИСТИНА ЦАНКОВА АНГЕЛОВА на тема „РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА АЛЦХАЙМЕР“

За изготвяне на рецензията докторант д-р Христина Ангелова е представила изискуемите материали (дисертация, автореферат, публикации, автобиография). Рецензията е изготвена съгласно изискванията на ЗРНСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника за прилагането му в ИНБ-БАН.

Предоставеният за рецензия материал е от 101 страници и съдържа всички необходими раздели: Увод (1 стр), Литературен обзор (26 стр), Цел и задачи (1 стр), Материали и методи (9 стр). Резултатите са представени на 19 стр, Обсъждането на 10 стр, Изводите и приносите - на 2 стр. В работата са цитирани 344 литературни източника.

Обзорът е обширен и добре структуриран. Разгледани са формите на Алцхаймеровата болест, мозъчните промени, които настъпват при развитието ѝ, отговорните за възникването ѝ генетични и епигенетични фактори, тези на средата и съществуващи съпътстващи заболявания. Добре представени са и двете основни съвременни хипотези за обяснение на патогенезата на това заболяване – хипотеза за амилоидната каскада и хипотеза за хиперфосфорилирания тау-протеин. Специално място е отредено на ролята на пептидите в развитието на АД. Докторантката акцентира върху и подробно описва наличните литературни данни за киторфина – разпространението му в ЦНС, синтез и разграждане, рецептори и плътността им в различни мозъчни структури, рецепторната сигнализация. Ясно разграничени са собствените ефекти на пептида от въздействията, които осъществява чрез другите опиоиди. Начинът, по който е изложен този материал, логичното му подреждане и илюстрирането му със 7 схеми показват обширните и стабилни познания на дисертантката в областта, в която работи. Запозната е добре с литературата, което ѝ дава възможност свободно и убедително да интерпретира собствените резултати. Изчерпателният литературен обзор е база за адекватно формулиране на научната цел и произтичащите от нея задачи за целенасочени изследвания, като специално се подчертава, че за сега няма яснота относно причините за възникването на АД, както и че неаналгетичните ефекти на пептида са слабо проучени. Базирайки се на наличните

литературните данни, че 1) КТР участва в процесите на възпаление и хронична болка, 2) в етиологията на AD при пациенти с невродегенеративни заболявания и 3) установеното от други автори понижено ниво на КТР при развитие на AD, дисертантката формулира хипотезата, че този пептид има роля в патофизиологията на заболяването. Това е и **целта** на дисертационния труд — да изследва ролята на КТР върху поведението и хистологичните промени, настъпили в резултат на развитие на симптомите на AD, използвайки модела на i.c.v. въвеждане на стрептозотоцин у плъхове. Произтичащите от целта задачи (3 бр.) включват изучаване на ефекта на различни дози КТР върху изследователското поведение и паметта на здрави животни, през ранната фаза на развитие на AD (1 месец след стрептозотоцин) и късната фаза (4 м. след стрептозотоцин). Успоредно с това е изследвано отлагането на α -амилоид в хипоталамуса и мозъчните кръвоносни съдове.

Прави добро впечатление, че при разработката са използвани голям набор подходящи, различни по характер **методи** - за изследване на двигателната активност и паметта (open field, elevated Plus-maze, T-maze, Novel object recognition test), за болкова чувствителност (paw pressure test), така и хистологични и биохимични такива. Това позволява успоредно с поведенческите промени да се регистрират и промените в хистологичните и биохимичните показатели, които съпътстват развитието на заболяването (броя на невроналните глетки в хипокампа C1 и C3 полета, невроналната плътност и промяната в количеството на карбонилирани протеини в кръвна плазма).

Резултатите от поведенческите, хистологични и биохимични изследвания са представени последователно в рамките на един раздел, което способства за изграждане на пълна картина на промените, настъпващи в изследваните стадии на заболяването и повлияването им от пептида КТР. Те са подробно описани и онагледени с 26 фигури. Статистическите методи са внимателно подбрани съобразно характера на експеримента.

Експерименталните данни, обобщени в **обсъждането**, показват че:

При здрави плъхове КТР, въведен i.c.v., не променя способността за обучение и запаметяване на опитните животни и не предизвиква оксидативни промени.

Въведен i.c.v. през ранната фаза на AD (1 месец след прилагане на стрептозотоцин) КТР предотвратява загубата на неврони в CA3 полето на хипокампа, но е без ефект върху загубата им в CA1 полето. Т.е. третирането с дипептида предотвратява увреждането на работната памет при тези животни, но няма ефект върху образуването на амилоидни агрегати. Съпроставяйки получените в изследването резултати с публикувани в литературата факти от медицински изследвания на пациенти, боледували от AD, дисертантката изказва логическото предположение, че при тези условия пониженото ниво на КТР вероятно води до намален синтез на NO и нарушаване на NO хомеостазата, което от своя страна ускорява развитието на AD. Съпоставянето и с други лит данни дава основание на д-р Ангелова да предположи, че протективния ефект на КТР, демонстриран при нейните експерименти, включва вероятно и NO-зависим път.

През късната фаза на AD се наблюдават тежки нарушения както в пространствената, така и в работната памет, повишена двигателна активност и понижено ниво на тревожност, съпътствано от загуба на неврони и повишено ниво на увредени протеини в хипокампа. В този етап от развитието на AD КТР оказва незначителен ефект върху развитието на заболяването

Изводите коректно обобщават получените в изследването резултати. Основно значение според мен има извод 2 – ефектът на КТР е изразен в ранните етапи от развитието на AD, като предотвратява отклоненията в поведението и премахва STZ-предизвиканата амнезия. Приемам напълно приносите (3 на брой). Те формулират най-съществените получени оригинални данни.

Авторефератът отразява най-съществените и приносни резултати на дисертационния труд, публикациите и участията на научни форуми, на които са представяни. Има и резюме на работата на английски език.

Заклучение

Дисертацията е посветена на проучване на ефектите на дипептида киоторфин върху промените (поведенчески, морфологични, биохимични), предизвикани от развитието на AD през различните й етапи. За това заболяване, безспорно много социално значимо, до сега не са безспорно установени нито причините, нито механизма на възникването му, поради което лечението е само симптомотично. Задачата, която си поставя дисертантката, е свързана с усилието да се проучи по-детайлно един от възможните пътища (основни или съпътстващи) за възникването на AD, респективно за намиране на средство за забавяне на развитието й. При разработването на дисертационния труд са използвани подходящи методи за изследване, даващи надеждна информация за поведенческите, хистологичните и биохимични промени. Резултатите са убедителни, логично групирани, стегнато описани и пригледно илюстрирани. Обширният лит обзор е добра основа както за обосновка на темата на дисертацията, така и за обективна дискусия. Дисертантката показва завидна способност да свързва логически установеното от други автори със собствените резултати. Направените изводи изясняват участието на пептида киоторфин при развитието на AD.

Данните от проучването са публикувани в 4 статии, като във всички д-р Ангелова е водещ автор, и са представени на 11 научни форума. Общият брой точки от публикациите е 38,6. Две от публикациите са цитирани общо 8 пъти. Трудът напълно покрива количествените показатели и отговоря на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и Наредбата за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ Дисертационният труд ме убеждават безусловно да подкрепя присъждането на образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност “Фармакология” на д-р Христина Цанкова Ангелова

10.06.2023 г.

Рецензент

София

проф. д-р Р. Замфирова

OPINION

Concerning a thesis aimed at public defence for awarding the PhD degree in higher education field 4. Natural sciences, professional field 7.1. Medicine. Scientific specialty “Pharmacology (incl. Pharmacokinetics and Chemotherapy)” (code 03.01.24)

entitled “ "ROLE OF KYOTORPHINE on BEHAVIORAL AND HISTOLOGICAL CHANGES CAUSED BY AN EXPERIMENTAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEAS by doctoral student DR. CHRISTINA TSANKOVA ANGELOVA .

The dissertation was developed under the supervision of Assoc. Prof. Daniela Pehlivanova , PhD, INB, BAS and Prof. Elena Dzambasova, PhD, Dept.of Medicine, SU “Kliment Ohridski”

The review was prepared in accordance with the the ZRASRB, the Regulations for its application and the Regulations for its application in the INB, BAS.

To prepare the review, PhD student Hristina Angelova submitted the required materials (dissertation, abstract, publications, resume).

The presented work includes 101 pages and contains all the necessary sections: Introduction (1 page), Literature review (26 pages), Aim and tasks (1 page), Materials and methods (9 pages).

The results are presented on 19 pages, the discussion on 10 pages, the conclusions and contributions - on 2 pages. 244 literary sources are cited in the work.

The **review** is extensive and well structured. The forms of Alzheimer's disease, the brain changes during its development, genetic and epigenetic factors, responsible for its occurrence, the role of environmental factors and concomitant diseases are considered. The two main hypotheses to explain the pathogenesis of this disease are presented - the hypothesis of the amyloid cascade and the hypothesis of the hyperphosphorylated tau protein. A special place is given to the role of peptides in the development of AD. The available literature data on kyorthorphin are presented in detail. A separate chapter outlines the available literature on its distribution in the CNS, synthesis and degradation, receptors and their density in different brain structures, receptor signaling . The dipeptide's own effects and those exerted indirectly by influencing other opioids are clearly distinguished. Angelova emphasis that for now there is no clarity regarding the causes of the occurrence of AD, as well as the poorly studied non-analgesic effects of the KTP The way of presentation of the material , its logical arrangement and illustration with 7 schemes shows that the doctoral student has extensive and stable knowledge in the field. She is well-informed with the literature. It enables her to discuss freely and convincingly the own results. The comprehensive literature review is a basis for adequate formulation of the scientific goal and the resulting tasks for targeted research

Based on the available literature data that 1) KTP is involved in the processes of inflammation and chronic pain, 2) in the etiology of AD in patients with neurodegenerative diseases and 3) the reported by others reduced level of KTP in the development of AD, the doctoral student

formulates the hypothesis that the peptide has a role in the pathophysiology of this disease. This is **the aim** of the dissertation - to study the role of kytorphine on behavioral and histological changes caused by i.c.v. administered STZ (experimental model of AD)

Tasks arising from the aim, include the study of influence of different doses of KTP on the behavior and memory of healthy animals, during the early phase of AD development (1 month after Streptozotocin) and the late phase (4 months after STZ). In parallel, the deposition of β -amyloid in the hypothalamus and cerebral blood vessels was followed.

It gives a good impression that a large set of appropriate, different experimental models and **methods** were used in the investigation. Methods for studying motor activity and memory (open field, elevated Plus-maze, T-maze, Novel object recognition test), pain sensitivity (paw pressure test), as well as histological and biochemical ones were used. So, in parallel with the behavioral, the accompanying changes in the histological and biochemical parameters are registered (the number of neuronal cells and neuronal density in the hippocampal CA1 and CA3 fields, the amount of carbonylated proteins in blood plasma).

The **results** are described in detail and illustrated with 26 figures. The statistical methods are carefully selected according to the experiment.

The results of the behavioral, histological and biochemical studies are presented in parallel. It helps to construct a complete view of the changes occurring in the studied stages of AD and their influence by the dipeptide tested. The experimental results, summarized in the **discussion**, show that:

In healthy rats, KTP administered i.c.v. has no effect on learning and memory and does not change the oxidative status of the experimental animals.

During the early phase of AD (1 month after streptozotocin administration), KTP applied i.c.v. prevented the loss of neurons in the CA3 field of the hippocampus, but does not protect their loss in the CA1 field., I.e. treatment with the peptide prevents damage to the working memory in these animals, but has no effect on the formation of amyloid aggregates. Comparing the results obtained with literature data on patients suffering from AD, the PhD student makes the logical assumption that under these conditions the reduced level of KTP is likely to evoke a reduced synthesis of NO and imbalance of NO homeostasis, which in turn accelerates the development of AD. The comparison with other lit. data gives Angelova reason to assume that the protective effect of KTP, demonstrated in her experiments, probably includes NO-dependent pathway.

In the late phase of AD in STZ treated rats significant disturbances in both spatial and working memory, increased motor activity and a decreased level of anxiety were observed. They are accompanied by a loss of neurons and an increased level of damaged proteins in the hippocampus. KTR has a negligible effect on this stage of the disease.

The conclusions correctly summarize the results obtained in the study. Of primary importance, in my opinion, is conclusion 2 - the effect of KTP is expressed in the early stages of the development of AD, preventing deviations in behavior and eliminating STZ-induced

amnesia. I fully accept contributions (5 each). They formulate the most essential original data obtained.

The auto-review reflects the most significant and contributing results of the dissertation work, publications and participation in scientific forums where they are presented. There is also a summary of the work in English.

Conclusion The dissertation aims to the study of the effects of kytorphine on the changes (behavioral, morphological, biochemical) caused by the various stages of AD. For this disease, which is undoubtedly very socially significant, until now neither the causes nor the mechanism of its occurrence is clear, that's why the treatment is only symptomatic. The present work is related to the effort to study in more detail one of the possible ways (main or secondary) for the occurrence of AD, respectively to find how to slow down its development. In the work, appropriate research methods giving reliable information about the behavioral, histological and biochemical changes are used. The results are logically grouped, tightly described and carefully illustrated. The extensive literary overview is a good basis for justifying the topic of the dissertation, as well as for an objective discussion. The PhD student shows an ability to connect logically the findings of other authors with her own results. The conclusions clarify the participation of the peptide kyorphin in the development of AD The abstract reflects the most significant and contributing results of the dissertation work, publications and participation in scientific forums presented There is also a summary of the work in English.

The described includes results published in 4 articles and presented at 11 scientific forums. 8 citations of 2 papers are found.

The work fully covers the requirements and fits the ZRASRB, and its application rules, as well as the Regulation for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor"

The Thesis convinced me to support the award of the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Pharmacology" to DR. CHRISTINA TSANKOVA ANGELOVA .

10.06.2023

Sofia

Reviewer:

Prof. R. Zamfirova, PhD