



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

---

---

**ПЕТЯ ПЕТКОВА ИВАНОВА**

**НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА  
НОВОСИНТЕЗИРАНИ СУЛФАНИЛ ХИДРАЗНИ И  
МЕЛАТОНИНОВИ ПРОИЗВОДНИ С ХОЛИНЕСТЕРАЗНА  
ИНХИБИТОРНА АКТИВНОСТ ПРИ МОДЕЛИ НА БОЛЕСТ  
НА АЛЦХАЙМЕР И МЕЛАТОНИНОВ ДЕФИЦИТ**

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„ДОКТОР“ в професионално направление 7.1 Медицина научна  
специалност Фармакология

Научни ръководители:

проф. Яна Чекаларова, ИНБ БАН

проф. Виолина Стоянова, ФФ МУ София

София 2025



# БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

---

**ПЕТЯ ПЕТКОВА ИВАНОВА**

**НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА  
НОВОСИНТЕЗИРАНИ СУЛФАНИЛ ХИДРАЗНИ И  
МЕЛАТОНИНОВИ ПРОИЗВОДНИ С ХОЛИНЕСТЕРАЗНА  
ИНХИБИТОРНА АКТИВНОСТ ПРИ МОДЕЛИ НА БОЛЕСТ  
НА АЛЦХАЙМЕР И МЕЛАТОНИНОВ ДЕФИЦИТ**

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„ДОКТОР“ в професионално направление 7.1 Медицина научна  
специалност Фармакология

Научни ръководители:

проф. Яна Чекаларова, ИНБ БАН

проф. Виолина Стоянова, ФФ МУ София

София 2025

Дисертационната работа съдържа 111 стандартни машинописни страници и е онагледена с 24 фигури, 1 таблица и 5 схеми. Библиографията обхваща 107 заглавия, от които 107 англоезични, публикувани в близките 5 години.

Изследванията по дисертационната работа са извършвани в Институт по невробиология – БАН. На заседание на Научния съвет на ИНБ-БАН бе разкрита процедура за защита с протокол: №7 от дата 25.09.25г.

Защитата на дисертационната работа ще се състои на 13.11.25г. от 11ч. в залата на Институт по невробиология – БАН, ул. "Академик Г. Бончев", бл. 23, ет. 2, на открито заседание в състав на научното жури:

Председател: доц. д-р Даниела Пехливанова (ИНБ-БАН), рецензент

Членове:

проф. д-р Милка Милева (Институт по микробиология), рецензент

доц. д-р Елина Цветанова (ИНБ-БАН), становище

проф. д-р Жоржета Бочева (МФ-МУ София) становище

проф. д-р Магдалена Кондева-Будина, (ФФ-МУ София), становище

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в библиотеката на Институт по невробиология на БАН, бл. 23, ет.

# СЪКРАЩЕНИЯ

Латиница (A–Z)

A $\beta$  / A $\beta_{1-42}$  —  $\beta$ -амилоиден пептид

ADAM10 —  $\alpha$ -секретаза

ACh — Ацетилхолин

AChE — Ацетилхолинестераза

APP — Амилоиден прекурсорен протеин

BACE1 —  $\beta$ -секретаза 1

BDNF — Мозъчен невротрофичен фактор

CREB – транскрипционен фактор

pCREB — фосфорилирана форма на транскрипционния фактор

DI — Дискриминационен индекс

DMSO — Диметилсулфоксид

ELISA — Ензимносвързан имуносорбентен анализ.

ERK1/2 – Екстрацелуларно регулирани кинази 1/2

pERK1/2 — Фосфорилирани екстрацелуларно регулирани кинази 1/2

GSH — Глутатион.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — Водороден пероксид.

HRP — Хрян пероксидаза

Icv/ицв — Интрацеребровентрикуларно

i.p. — Интраперитонеално

LD<sub>50</sub> — Летална доза за 50%. преживяемост

MDA — Малондиалдехид

## СЪКРАЩЕНИЯ

MT1 – Мелатонинов рецептор 1  
MT2 — Мелатонинов рецептор 2  
OD — Оптична плътност  
OLT —тест за разпознаване на локация на обект  
ORT —тест за разпознаване на обект  
pin — Пинеалектомия  
pTau — Фосфорилиран тау-протеин  
ROS— Реактивни кислородни видове  
SIRT1 —Сиртуин1  
SOD1— Супероксид дисмутаза  
SEM — Стандартна грешка на медиана  
TMB — 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин  
veh —разтворител  
Y-maze — Y-образен лабиринт

Кирилица (А–Я)

БА — Болест на Алцхаймер.

КМБ — Кръвно-мозъчна бариера.

НЛ – Нова локация

НО - Нов обект

ПЛ – позната локация

ПО - Познат обект

Болестта на Алцхаймер (БА) представлява прогресивно невродегенеративно заболяване, което засяга предимно населението над 65 годишна възраст. Характеризира се с постепенно влошаване на паметовите функции и нарушения в когнитивните процеси. На фона на глобалното застаряване, БА се превръща в значимо медицинско и социално предизвикателство, което е отговорно за повечето случаи на деменция, ограбвайки последните дни пълноценен живот на възрастните хора. Епидемиологичните данни предвиждат трайна тенденция към нарастване на болестта, което налага търсене на нови подходи способни не само да облекчат симптомите, но и да забавят патофизиологичните механизми на заболяването, предоставяйки на болелите едни достойни старини.

Съвременните терапии осигуряват частично подобрене и временно стабилизиране на когнитивните функции, но ефективността им е ограничена и не води до забавяне прогресията на заболяването. Затова се налага необходимост от разработване на мултимоделни подходи, които таргетират няколко патологични механизма като комбинират облекчаване на острата симптоматика с невптотективен ефект.

Настоящия дисертационен труд се фокусира върху два ключови механизма широко свързани с БА: оксидативния стрес и нарушенията в ацетилхолиновата невротрансмисия. Ефективни агенти, които повлияват тези механизми са: мелатонина със своя силен антиоксидантен ефект и Донепезила като ацетилхолинестеразен инхибитор. Доказаното благоприятно действие на двете вещества са комбинирани в синтеза на хидразид-хидразонов хибридни съединения с условни наименования: **3a и 3c.**

Хидразид-хидразоновите хибридни молекули са част от работата проф. Стоянова и екип, която се изразява в синтез от над 30, спектрално чисти, вещества. Тяхното действие беше изследвано с няколко различни метода, както следва: *in silico* и докинг анализ, биохимичен анализ на веществата, *in vitro* и *in vivo* миши модел на деменция. Благодарение на резултатите на колегите от МУ бяха подбрани най-потенциалните вещества за по-обстоятелствен и акуратен модел на БА.

Фокусът на изследванията е насочен върху оценката на ефективността на двете новосинтезирани хибридни съединения чрез поведенчески и биохимични маркери при плъши модел на БА, индуциран в условия на мелатонинов дефицит. Избраният експериментален модел е валидиран чрез репродукция на ключови патофизиологични характеристики, наблюдавани при човешката форма на заболяването като изразен когнитивен дефицит, активиране на амилоидогенния сигнален път и оксидативен стрес, включително нарушения в редокс-хомеостазата.

Настоящия дисертационен труд има за **цел** да надгради досегашните изследвания върху най-перспективните съединения, синтезирани от проф. Стоянова и екипа ѝ, като се фокусира върху разширено *in vivo* проучване на ефектите на две от най-активните новосинтезирани хидразид-хидразонов хибридни молекули – **3a и 3c** чрез реализиране на експериментален дизайн насочен към спецификите на БА. Веществата са селектирани въз основа на проведени *in silico*, *in vitro* и *in vivo* охарактеризирания[1,2]. За целта се използва иновативен *in vivo* хибриден модел при плъхове, комбиниращ мелатонинов дефицит (чрез пинеалектомия) и интрацеребровентрикуларна (ицв) инфузия на олигопептида  $A\beta_{1-42}$ , с цел симулиране на ключови аспекти от патологията на БА.

За постигане на целта, бяха формулирани следните основни задачи:

- ✓ Създаване и охарактеризиране на *in vivo* плъши хибриден модел чрез пинеалектомия и ицв инфузия на  $A\beta_{1-42}$ , имитиращ състояния на мелатонинов дефицит и  $A\beta$  невротоксичност, типични за БА.
- ✓ Изследване ефектите на субхронично третиране на 3a и 3c върху различни аспекти на паметта (работна, краткосрочна пространствена и разпознавателна) при мелатонинов дефицит+ицв  $A\beta_{1-42}$ .
- ✓ Проучване ефектите на 3a и 3c върху индуцираната при модела повишена експресия на  $A\beta_{1-42}$  в хипокампални хомогенати.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

- ✓ Проучване ефектите на 3а върху маркери за оксидативен стрес – анализ на промените в оксидативния баланс в хипокампа след третиране с 3а при модел на БА.
- ✓ Проучване ефектите на 3с върху ацетилхолинестеразни нива в хипокамп при хибридният модел на БА.
- ✓ Сравнителен анализ на ефектите на мелатонин и 3с - изследване и сравнение на въздействието им върху вътреклетъчни и рецепторни компоненти на неамилоидогенния сигнален път, който се предполага като потенциална терапевтична мишена при хибридният модел на БА.

## 1. Експериментални животни

Бяха използвани мъжки полово зрели плъхове порода Wistar, с тегло 250-300 гр., предоставени от развъдната база към Институт по невробиология (ИНБ)-БАН в гр. Сливница. Всички добри практики за работа с лабораторни животни бяха спазени в пълно съответствие с директива 2010/63/ЕС на Съвета на Европейските общности и одобрение от Българската агенция по безопасност на храните (протокол № 347).

## 2. Експериментален дизайн и разпределение на животните по кохорти

Схематично експерименталния дизайн е представен на Фиг. 1. Изхождайки от спецификата на предходните резултати на база *in vitro* и *in vivo*, бяха обособени две независими кохорти от животни за изследване ефектите на молекулите **3с** и **3а**:

**Кохорта I** – Изследване на веществото **3с**. Тази кохорта включваше общо 32 животни, разпределени в четири групи по 8 животни всяка: **Sham (контролна) група**, с приложена шам процедура /без отстраняване на епифиза/ и ицв инфузия на разтворител на  $A\beta_{1-42}$ , със субхронично /21 дни/ интраперитонеално /и.п./ третиране с разтворител; **Моделна група (pin- $A\beta_{1-42}$ )** – животните бяха подложени на пинеалектомия и ицв инфузия на  $A\beta_{1-42}$  с цел индуциране на БА-подобна патология и последващо субхронично и.п. третиране /21 дни/ с разтворител; **pin- $A\beta_{1-42}$  + 3с** – моделна група, третирана и.п. за 21 дни с **3с**, в доза от 10 мг/кг; **pin- $A\beta_{1-42}$  + мелатонин** – моделна група, третирана по

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

аналогичен начин с референтното съединение мелатонин в доза от 10 мг/кг, използвано като положителна контрола.

**Кохорта II** – Изследване на веществото **3a**. В тази кохорта, третиранията и дозите бяха аналогични на кохорта I, като бяха включени 48 животни, разпределени в шест групи по 8 животни: **Sham + физиологичен разтвор** (контрола); **Sham + мелатонин** – за сравнение с референтния агент при липса на патология; **Sham + 3a** – за оценка на евентуални странични ефекти на **3a** при ненарушена физиология; **pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub> + физиологичен разтвор**; **pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub> + мелатонин** – моделна група, третирана с мелатонин; **pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub> + 3a** – моделна група, третирана с **3a**;

## 3. Хибриден експериментален модел

С цел по-акуратно възпроизвеждане на ключови патогенетични механизми, характерни за БА, бяха приложени две последователни хирургични интервенции в рамките на 7 дни:

- 1) Пинаелектомия извършена за елиминиране на ендогенния синтез на мелатонина като хормон, от епифизата и имплантиране на канюли в латералните мозъчни вентрикули и
- 2) ицв инфузия на A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

### 3.1. Пинаелектомия и имплантиране на канюли в страничните мозъчни вентрикули

Животните бяха анестезирани чрез и.п. инжектиране на комбинация от кетамин (80 мг/кг) и ксилазин (20 мг/кг) и фиксирани на стереотаксичен апарат (Stoelting, Europe). По време на оперативните процедури, плъховете бяха поставени върху платформа за

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

поддържане на телесната температура. Отстраняването на епифизната жлеза бе осъществено съгласно утвърдената методика на Hoffman и Reiter [3], рутинно прилагана и адаптирана в експерименталната практика от екипа в Направление “Поведенческа невробиология” [4,5].

Непосредствено след пинаелектомията бяха имплантирани двустранно канюли в страничните мозъчни вентрикули, използвайки координатите от атласа на Paxinos и Watson[6,7]: предно-задна (AP) = -0.8 mm, латерална (L) =  $\pm 1.5$  mm, дълбочина (H) = 3.8 mm.

Следоперативният период включи стандартна аналгезия и субкутанно инжектиране с Рингеров разтвор с лактат и антибиотик (гентамицин).

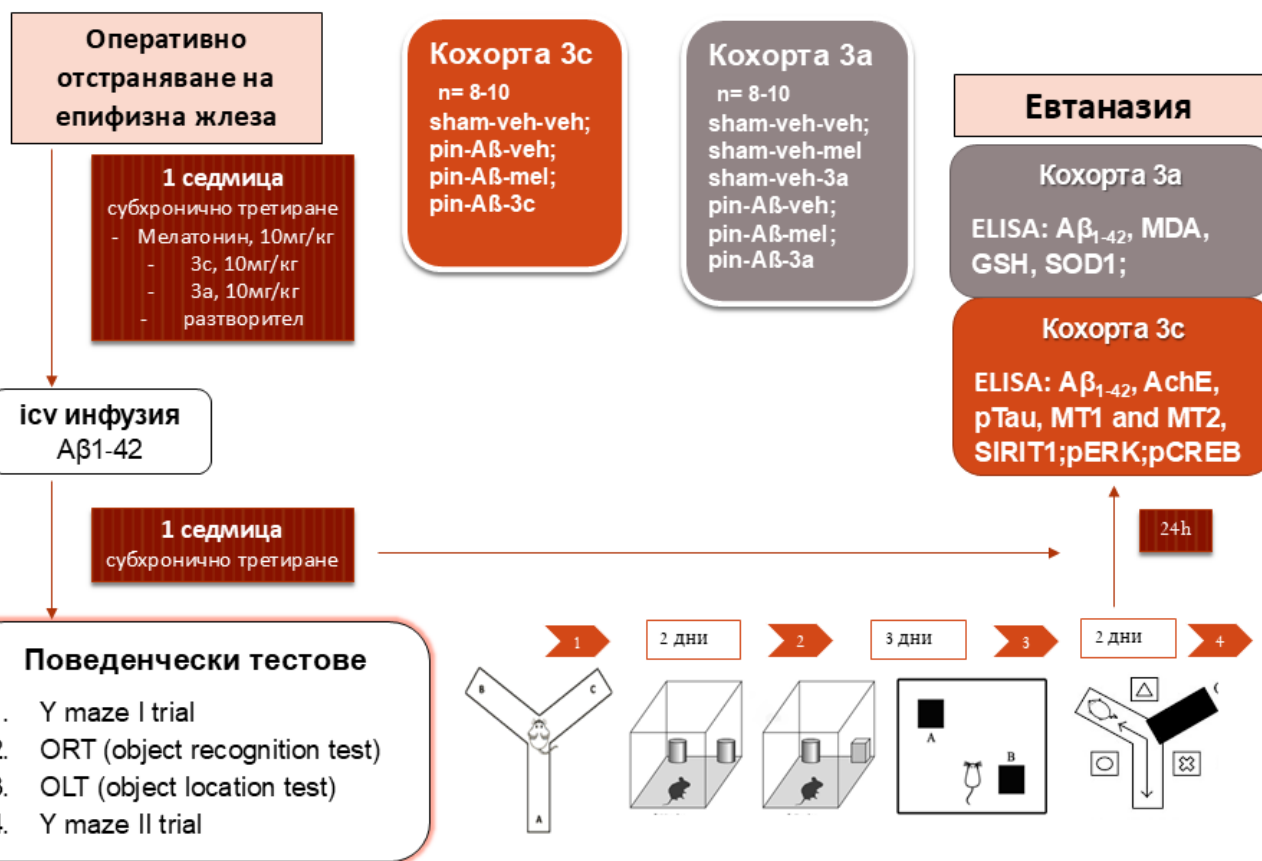
## 3.2. Интрацеребровентрикуларна (icv) инфузия на амилоид-бета ( $A\beta_{1-42}$ )

Интрацеребровентрикуларната инфузия на  $A\beta_{1-42}$  се осъществи с помощта на 5-микролитрова хамилтонова спринцовка с постоянна скорост от 1  $\mu$ л/мин за 5 минути чрез автоматичен микроинжектор. След приключване на инфузията, иглата остана на място за допълнителни 2 минути преди изтегляне.

При животните от контролната (sham) група беше приложена аналогична процедура, като вместо  $A\beta_{1-42}$  бе инфузиран PBS.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## Дизайн на експериментите



Фигура. 1 Експериментален дизайн на проведените тестове и манипулации на двете кохорти (I и II): 1. Пиналектомия -1 седмица третиране с **3c/3a**/мелатонин/физиологичен разтвор- 2. Интрацеребровентрикуларна (ицв) инфузия на бета амилоид (Aβ<sub>1-42</sub>) – 1 седмица третиране с **3c/3a**/мелатонин/физиологичен разтвор- 3. Поведенчески тестове, Y-лабиринт в два протокола в интервал от 5 дни/тест за разпознаване на локация на обект/тест за разпознаване на обект; 4. Евтаназия и изолиране на ляв и десен хипокамп; 5. Биохимични анализи, Кохорта I: Aβ<sub>1-42</sub>, p-Тау протеин (pTau), Ацетилхолинестераза, мелатонинови рецептори MT1 и MT2, фосфо-ЕРК (pERK), фосфо-КРЕБ (pCREB), Сиртуин1 (SIRT1) ; Кохорта II: Aβ<sub>1-42</sub>, малондиалдехид (MDA), глутатион (GSH), супероксид дисмутаза1 (SOD1).

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 3.3. Субхронично третиране с мелатонин, **3с** и **3а**

Непосредствено след оперативните интервенции, в зависимост от експерименталната група, бе осъществено субхронично и.п. третиране с разтворител (1% разтвор на хидроксиетилцелулоза), мелатонин 10 мг/кг, **3с** 10 мг/кг и **3а** 10 мг/кг, съответно. На седмият ден след хирургичната интервенция беше извършена ицв инфузия на невротоксин  $A\beta_{1-42}$  (за  $A\beta_{1-42}$  групите) и PBS (за veh групите). Последва още една седмица на субхронично третиране със съответните съединения.

## 4. Поведенчески тестове

Поведенческите тестове бяха осъществени, в рамките на една седмица, 14 дни след осъществената пинеалектомия и 7 дни след ицв инфузията на  $A\beta_{1-42}$ . Когнитивните функции бяха изследвани чрез прилагане на тестове за оценка на оперативна, краткосрочна разпознавателна и пространствена памет, включително . Третиранията на експерименталните групи с разтворител, мелатонин, **3с** или **3а** се осъществяваха непосредствено след провеждане на съответния тест.

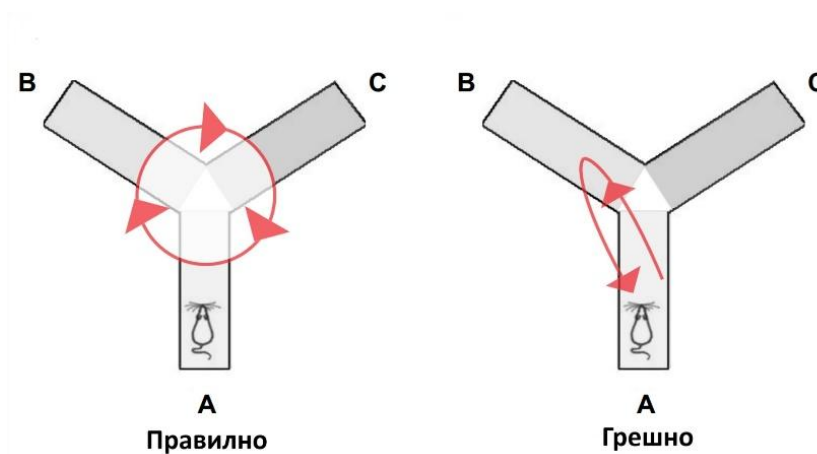
### 4.1. Y лабиринт, тест за изследване на спонтанни алтернации (SAB)

Този поведенчески метод, представен на фиг. 2 има за цел да определи нарушенията в хипокамп-зависимата работна памет. Животните бяха поставени в централната зона на апарата, със свободен достъп до трите рамена, след което им бе позволено да се движат свободно в рамките на 8 минути. Проследен беше естественият избор на рамената, без външна стимулация, като бяха отчетени влизанията във всяко едно от трите рамена. За

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

правилна алтернация се счита, когато плъхът влезе в трите рамена последователно, напр. АСВ, АВС, СВА. За грешка на оперативната памет се приема повторно влизане в едно от рамената или липсата на трираменни алтернации, напр. АВВ, САА, ВСВ, АВА. Тя се отчита чрез уравнение 1 към фигура 2[8].

$$\% \text{ спонтанни алтернации} = \left( \frac{\text{общ брой влизания}}{\text{правилни алтернации} - 2} \right) * 100$$



Фигура 2. Схематично представяне на Y-лабиринт протокол 1, където на първото изображение е представена правилната алтернация, а на втората оперативна грешка.

## 4.2. Тест за разпознаване на непознат обект (Object recognition test, ORT)

Чрез този тест са прави оценка на епизодичната памет и разпознавателните способности при гризачи. Тестът се извършва в непрозрачна кутия тип открито поле с размери 50x50cm (Фиг. 3) .

ORT се провежда в три основни фази:

(1) Фаза на хабитуация: животните бяха поставени в тестовата кутия без обекти, за да привикнат към новата среда в рамките на 10 минути.

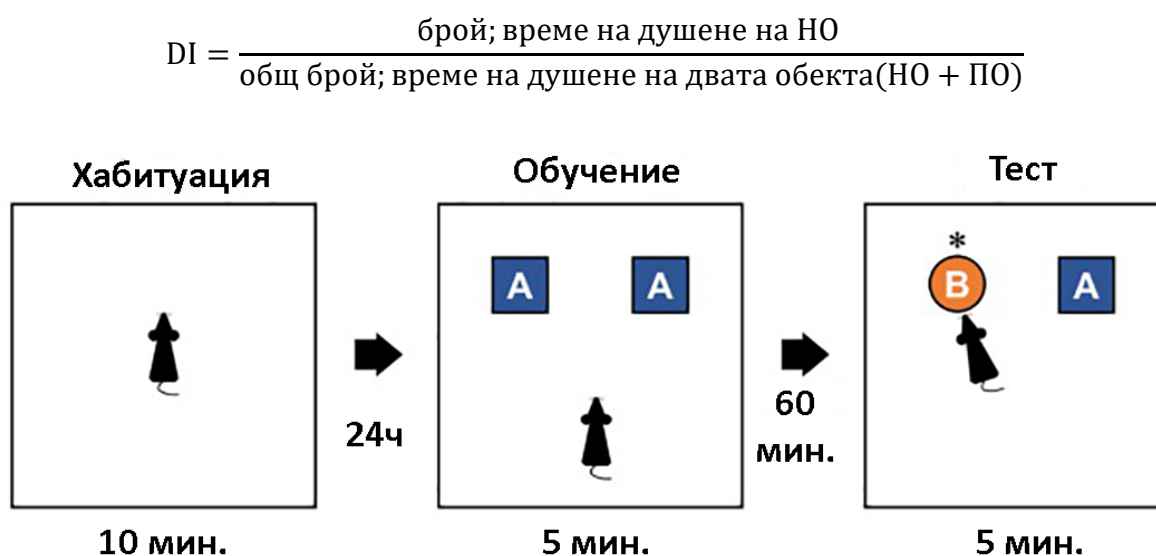
## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

(2) Фаза на обучение: извършва се 24 ч след хабикуацията. Два идентични обекта (А) бяха поставени в противоположните ъгли на кутията. Животните бяха оставени да ги изследват в рамките на 5 минути. Беше отчетено предпочитанието на гризака към един от двата предмета и този предмет беше определен за „познат“.

(3) Тестова фаза: Извършва се 60 мин. след обучението. Обекта, към когото животното има по-малък интерес беше заменен с напълно непознат обект (В).

Параметрите, които бяха отчетени са: време на душене на новия обект (НО) и познатия обект (ПО), и брой докосвания на двата обекта. За оценка на паметовите функции беше използван дискриминационен индекс (DI) показан в уравнение 2 към фигура 7, където индекса представлява съпоставянето на афинитета на животното към НО спрямо общия интерес към двата обекта.

Висока стойност на DI показва съхранена разпознавателна памет. Намаляване на DI се свързва с когнитивен дефицит, какъвто се наблюдава при модели на БА [9].



Фигура 3. Схематично представяне на тест за разпознаване на непознат обект, където на първото изображение е представена хабикуацията, на второто обучението с два идентични предмета /обучителна фаза/, на третото – тест с непознатия обект /тестова фаза/.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 4.3. Тест за разпознаване на локация на обект (Object location recognition test, OLT)

Тестът за разпознаване на локация на обект OLT, представен на Фиг. 4, използва позитивно подкрепление поведенчески метод, прилаган за оценка на хипокампадно-зависимата пространствена памет при гризачи. Той се основава на естествената склонност на плъхове и мишки да изследват обекти, преместени на ново място, като индиректен маркер за памет за разположение в пространството. OLT определя функцията на дорзалния участък в хипокампа, конкретно CA1 и енториналната кора. В сравнение с ORT, теста за разпознаване на локация се счита за по-чувствителен спрямо увреждания в хипокампаалните субединици [10].

Протоколът за провеждане на OLT е сходен на ORT, затова беше изпълнен 24 ч след отчитането на поведението спрямо непознатия обект, вземайки под внимание факта, че животните вече бяха адаптирани към непрозрачната отворена кутия. Експериментът се проведе чрез използване на нови, абсолютно непознати, на животното предмети в последователност наподобяваща тази на ORT.

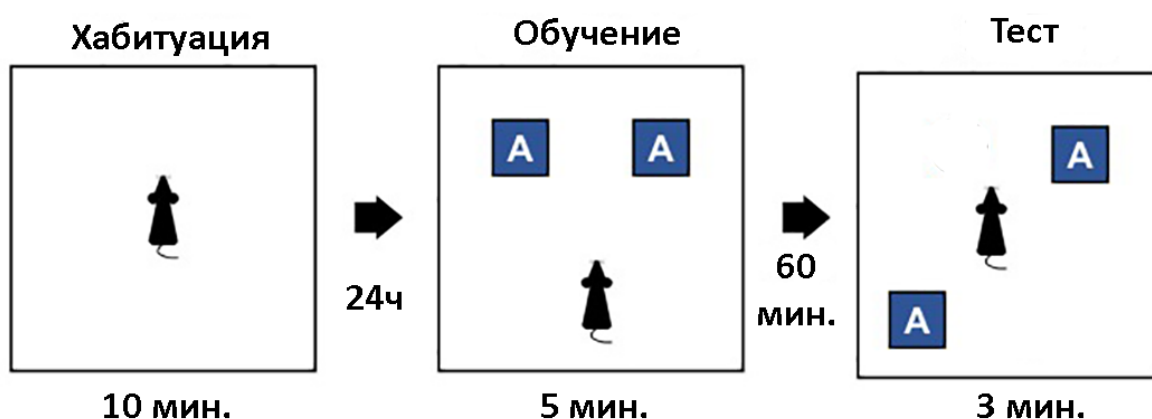
(1) Обучение: животните бяха поставени в тестовата кутия със свободен достъп до два идентични предмета на равно разстояние и оставени ги да ги опознават в рамките на 5 минути. Беше отчетен обекта, към който животното проявява по-голям интерес.

(2) Тестова фаза: 60 минути след провеждане на обучението, животните бяха върнати в тестовата кутия като позицията на предмета с по-малък интерес се промени диагонално на локацията на ПО и се определи за нова локация (НЛ). Гризачът беше оставен да опознава свободно двата обекта в рамките на 3 мин.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Поради технически причини и оптимизиране на протокола беше отчетено само времето, което животното прекарва в новата локация спрямо познатата. Състоянието на паметовите функции се определя от DI както следва в уравнение 3 към фигура 4. [11].

$$DI = \frac{\text{време на опознаване на НЛ}}{\text{време прекарано в двете локации (НЛ + ПЛ)}}$$



Фигура 4. Схематично представяне на тест за разпознаване на нова локация на предмет. На първото изображение е представена хабитуацията, 24ч след това се провежда обучението с два идентични предмета разположени на равни разстояния. Шестдесет минути след обучението, позицията на един от предметите се сменя и се провежда теста и отчитането.

### 4.4. Y-лабиринт – разпознаване на ново рамо (краткосрочна пространствена памет)

Вторият протокол на Y-лабиринта (Фиг. 5) се използва за оценка на краткосрочна пространствена памет. Тестът протича в две фази: обучение и тестова фаза.

(1) Обучението е показателно за консолидацията на паметта и се проведе 30 минути преди теста и отчитането. Животните бяха поставени в края на едното рамо, обявено за стартова позиция и влизанията в него не бяха отчетени. Беше предоставен свободен

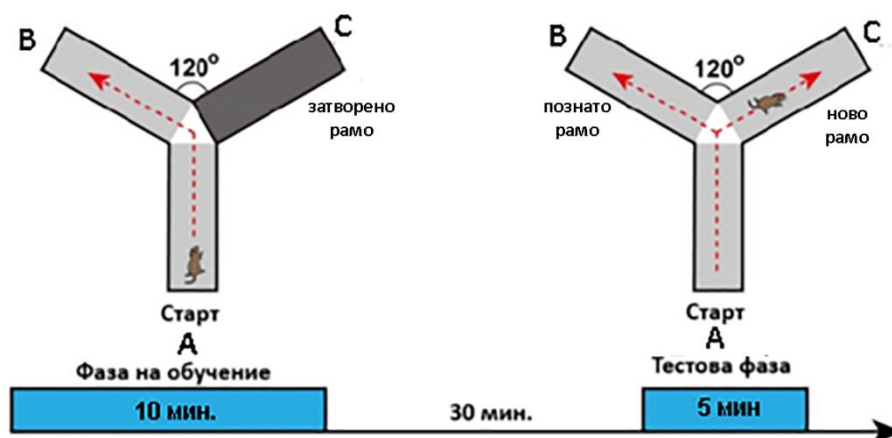
## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

достъп с цел опознаване на две рамена, а третото остана временно затворено. Обучението продължи 10 минути и откритото рамо срещу стартовата позиция се определи като „познато“.

(2) Тестова фаза: 30 минути след обучението отчитането се осъществи с отваряне и на третото рамо. Отчетени бяха броя влизания и времето на престой в познатото и новото рамо.

Данните бяха анализирани спрямо два параметъра: време за престой в едно от двете рамена и брой влизания, съответно. Отчита се дисриминационен индекс (DI) чрез уравнение 4 [12][13].

$$DI = \frac{\text{време (или брой) влизания в новото рамо}}{\text{общо време (или брой) влизания във всички рамена}}$$



Фигура 5. Схематично представяне на на тест за отчитане на краткосрочна пространствена памет чрез Y-лабиринт. На първото изображение се вижда фазата на обучение, която трае 10 минути с едно затворено рамо. След интервал от тридесет минути започва тестовата фаза на второто изображение, където всички рамена са отворени.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 5. Евтаназия и изолиране на ляв и десен хипокамп

### 5.1. Хомогенизиране на хипокампадна мозъчна структура от плъх

Едно денонощие след последния поведенчески тест и третиране с разтворител, мелатонин, **3с** или **3а**, съответно, животните бяха евтаназирани чрез гилотина и беше изолирана хипокампадна тъкан, замразена в течен азот и съхранена на  $-32^{\circ}\text{C}$  във фризур. Събраните хипокампи бяха хомогенизирани и подготвени за анализ чрез Ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA). Изолираните мозъчни структури бяха съхранени на  $-32^{\circ}\text{C}$  за по-малко от месец, след което бяха обработени в състояние подходящо за предстоящите биохимични анализи.

### 5.2. Тест за определяне на обща белтъчна концентрация по метода на Брадфорд

Методът на Брадфорд (Bradford Protein Assay) е колориметричен метод за количествено определяне на общо белтъчно съдържание в разтвори. [14] Определянето на общата белтъчна концентрация на всяка проба от мозъчна тъкан е от съществено значение за всеки биохимичен анализ, защото изравняването на белтъчното съдържание позволява точното отчитане на експресията на конкретна сигнална молекула и минимизира риска от грешки и отклонение от реалните стойности на белтъчна концентрация.

### 5.3. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)

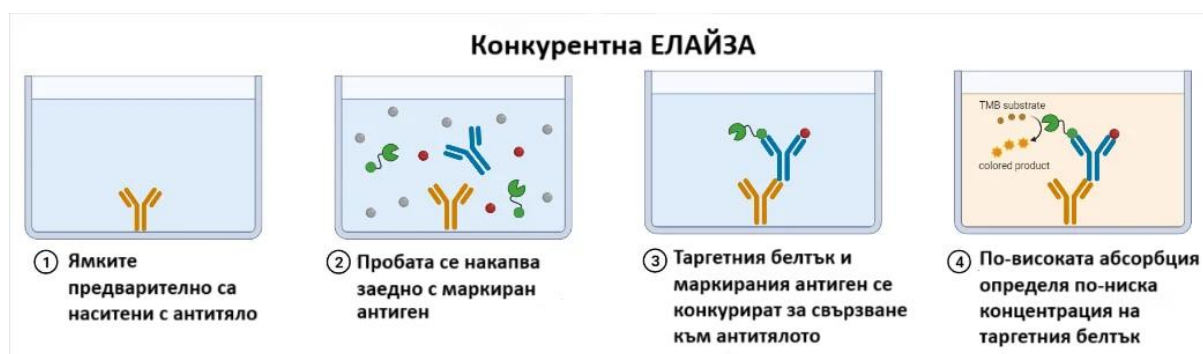
Хомогенатите от хипокампадна тъкан изравнени до концентрация на общ белтък 10мг/мл бяха анализирани с ELISA китове предоставени от Elabscience, Sunlong Biotech

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

и Abbexa Ltd. Сигналните молекули, проследени в настоящия труд бяха изследвани чрез два типа ELISA.

## 5.3.1. Конкурентен ензимно-свързан имуносорбентен анализ

С конкурентен тип (Фиг 6) бяха изследвани маркерите за оксидативен стрес от Кохорта II: Глутатион (GSH) с каталожен номер: E-EL-0026; Малондиалдехид (MDA) с каталожен номер E-EL-0060; Супероксид дисмутаза (SOD1) с каталожен номер E-EL-R1424.



Фигура 6. Схематично представяне на конкурентен метод ELISA, в който пробата и конюгатния разтвор се налива заедно, конкурирайки се за взаимодействие с анти тялото наситено на дъното на плаката.

## 5.3.2. ELISA тип сандвич

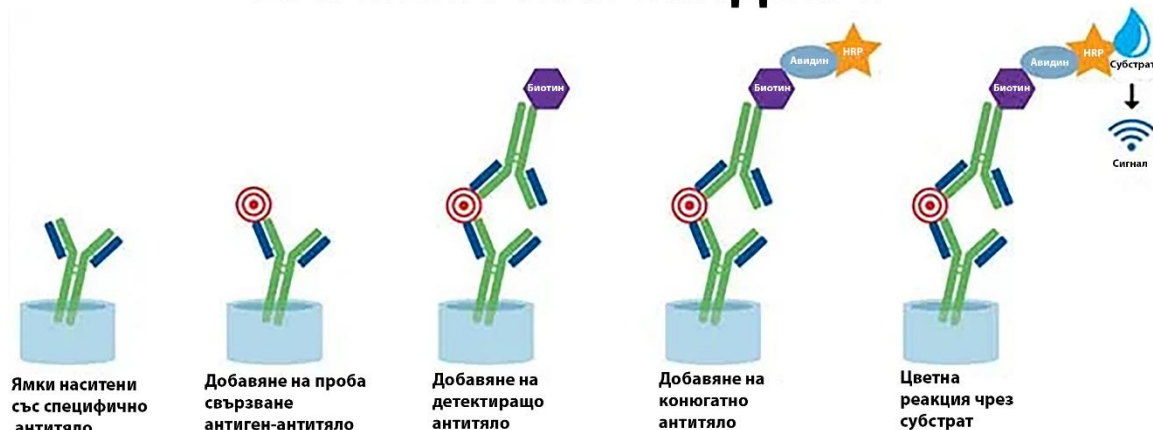
По-голямата част от сигналните молекули на двете кохорти бяха изследвани с ELISA тип сандвич (фиг 7):

- Двете кохорти:  $A\beta_{1-42}$  с каталожен номер: E-EL-R1402.
- Кохорта I: ацетилхолин естераза (AChE) с каталожен номер: E-EL-R0355; фосфолириран тау-протеин (pTau) с каталожен номер: E-EL-R1090; сиртуин 1 (SIRT1) с каталожен номер: E-EL-R1102; Мелатонинови рецептори 1 и 2 (MT1 и MT2) с каталожни номера: abx533982 и abx533985; фосфо-екстрацелуларна сигнално

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

регулирана киназа  $\frac{1}{2}$  (pERK  $\frac{1}{2}$ ) с каталожен номер: SL1579Ra; транскрипционен фактор pCREB с каталожен номер: SL1344Ra.

## ЕЛАЙЗА тип сандвич



Фигура 7 Схематично представяне на сандвич ELISA, където се използват две анти тела, вторичното съдържащо биотинов участък, за оптимална фиксация на таргетния белтък и отчетлив колориметричен сигнал.

## 6. Статистически анализ и обработка на данните

Получените резултати бяха обработени със SigmaStat, Graphpad Prism и Microsoft Excel.

За определяне нивата на сигналните молекули при биохимичния анализ бяха изведени полиномиални уравнения от трети порядък спрямо стандартите.

Всички данни са представени като средноаритметични стойности заедно със стандартните им грешки ( $\pm$  SEM). За подчертаване значимостта на резултатите беше използван двуфакторен вариационен анализ (ANOVA). За статистически значими се считаха резултатите със стойностите на  $p$  – критерия, както следва:  $p < 0.05^*$ ;  $p < 0.01^{**}$ ;  $p < 0.001^{***}$ .

Динамиката свързана със синтез на веществата доведе до факта, двете кохорти да бъдат работени през интервал от няколко месеца, което създаде условни разминавания като време за съхранение на тъканите и метеорологични промени. На базата на тези формалности беше решено, че резултатите от двете кохорти не могат да бъдат сравнявани. Въпреки невъзможността за съпоставяне ефектите на двете вещества, последователното тестване ни даде полезна информация свързана с оптимално приложение на модела и оценка на фармакологичните ефекти на хибридните мелатонинови аналози.

## 1. Кохорта I (3c)

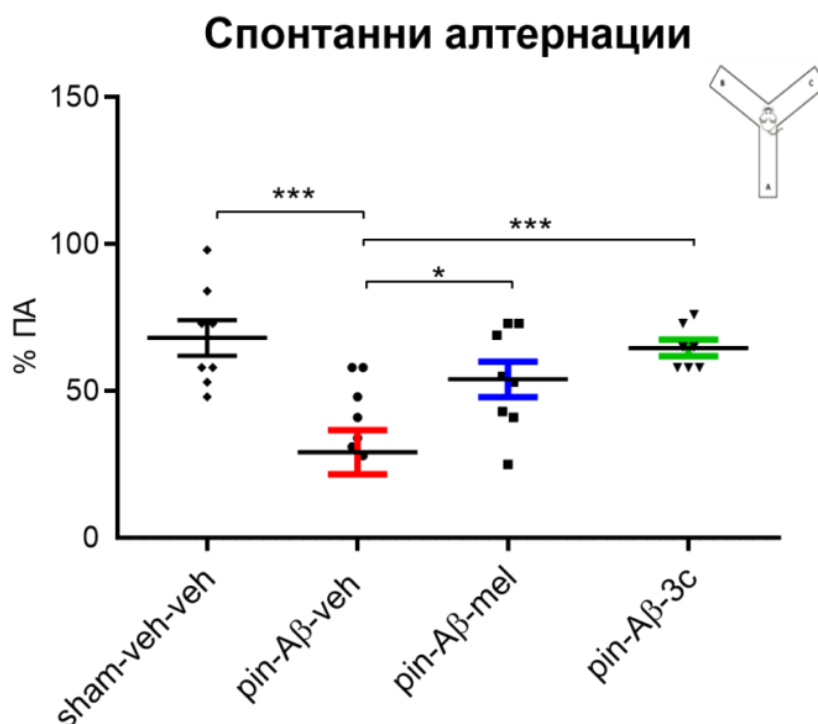
### 1.1. Ефекти на хибридното съединение 3c върху краткосрочните паметови функции при *in vivo* комбиниран модел на мелатонинов дефицит и БА

#### 1.1.1. Тест за спонтанни алтернации SAB (Y-лабиринт протокол 1)

Поведението на животните, оценено чрез теста за спонтанни алтернации в Y-лабиринт, проведен в първия ден от поведенческата тестова програма, имаше за цел да изследва работната и пространствена памет. При моделната група (pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-veh) се установиха нарушения в когнитивните процеси в сравнение с контролната група (sham-veh-veh) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), както е представено на фигура 8. Групата, третирана с хибридното вещество 3c (pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-3c) показва значително подобрение на показателите за пространствената памет, като прояви поведенчески профил, сходен с този на референтната група (pin-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-mel). При двете третирани групи се наблюдава

## РЕЗУЛТАТИ

статистически значим ефект спрямо моделната група (\*  $p = 0.02$  за pin-A $\beta_{1-42}$ -mel и \*\*\*  $p < 0.001$  за pin-A $\beta_{1-42}$ -3c спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh).



Фигура 8. Графично представяне на теста за спонтанни алтернации, където резултатите са оценени в % правилни **SAB**. Всяка група е с по 8 животни, данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на медиана (SEM).

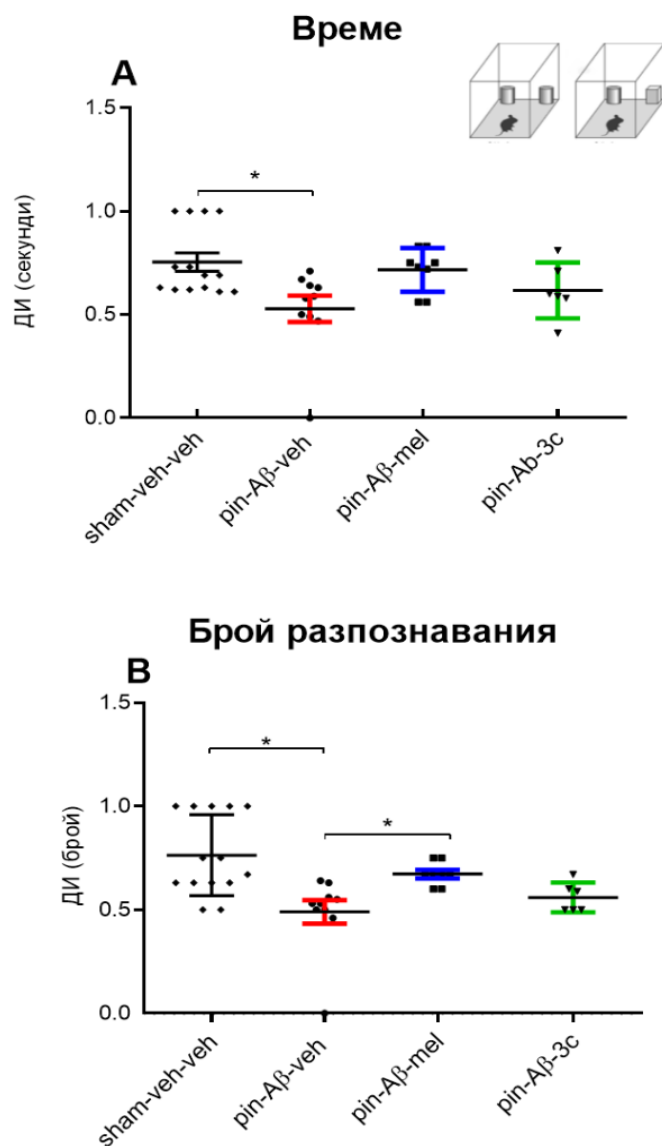
### 1.1.2. Тест за разпознаване на непознат обект (ORT)

Когнитивните способности на гризачите свързани с естественото им любопитство да изследват нови обекти бяха оценени чрез анализ на два показателя: брой докосвания на новия обект и времето, прекарано в неговото изследване изразени чрез DI. При моделната група третирана с разтворител се установи значително понижение на дискриминационните индекси както по отношение на времето, така и наброя докосвания, в сравнение с контролната група (\* $p < 0.05$  за време и \* $p < 0.05$  за брой влизания pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh) (фиг. 9). Позитивната контролна група показва поведенчески

## РЕЗУЛТАТИ

профил, сходен на контролната група брой докосвания на новия предмет (\* $p < 0.05$  pin- $A\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh) (фиг. 9B). Относно времето на изследване при двете третирани групи (pin- $A\beta_{1-42}$ -mel и pin- $A\beta_{1-42}$ -3c) се наблюдава тенденция към стойности, близки до тези на контролната група (sham-veh-veh), без обаче да се установи статистическа значима разлика спрямо моделната група (pin- $A\beta_{1-42}$ -veh).

### Тест за разпознаване на непознат обект



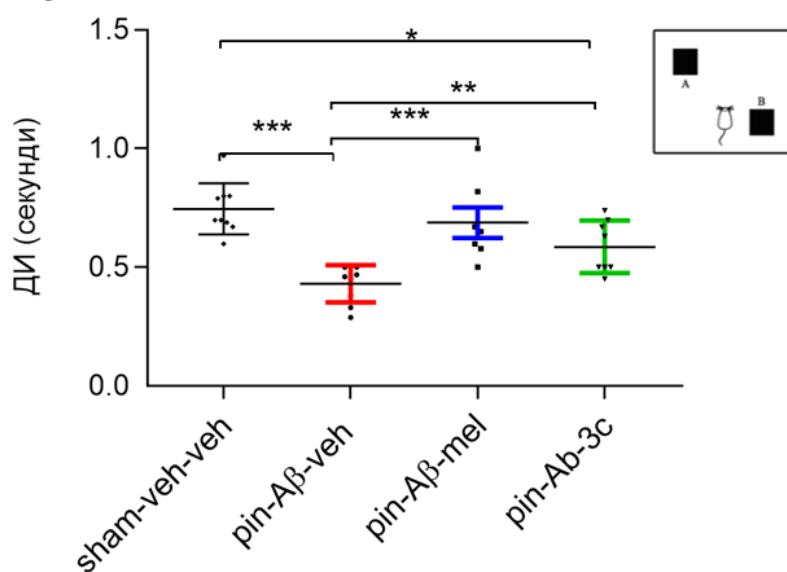
Фигура 9. Графично оформление на резултати, засягащи краткосрочната разпознавателна памет, изразяващи се в (A) време прекарано в опознаване (B) брой разпознавания на новия обект, изразени в дискриминационен индекс (DI) съпоставени с общото време на активност на животните.

## РЕЗУЛТАТИ

### 1.1.3. Тест за разпознаване на непозната локация на обект (OLT)

Тестът имаше за цел да установи нарушения в краткосрочната пространствена памет, свързана с разпознаването на обект, преместен в нова локация. Оценката се базираше на времето на спонтанната реакция на плъховете да изследват обект, разположен на различно място, спрямо познат предмет, поставен на същото място. Аналогично на резултатите от ORT, моделната група се характеризира с нарушена краткосрочна пространствена памет в сравнение с контролната група изразено чрез намален DI (\*\* $p < 0.001$  pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh). Въпреки статистическата значима разлика спрямо контролната група (\* $p < 0.05$ : pin-A $\beta_{1-42}$ -3с спрямо sham-veh-veh), животните от моделната група, третирани с хибридно съединение, проявиха поведенчески профил, сходен с този на плъховете третирани с мелатонин (\*\* $p < 0.001$ : pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -mel; и \*\* $p < 0.05$ : pin-A $\beta_{1-42}$ -3с спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh) (Фиг. 10).

### Тест за разпознаване на непозната локация на обект

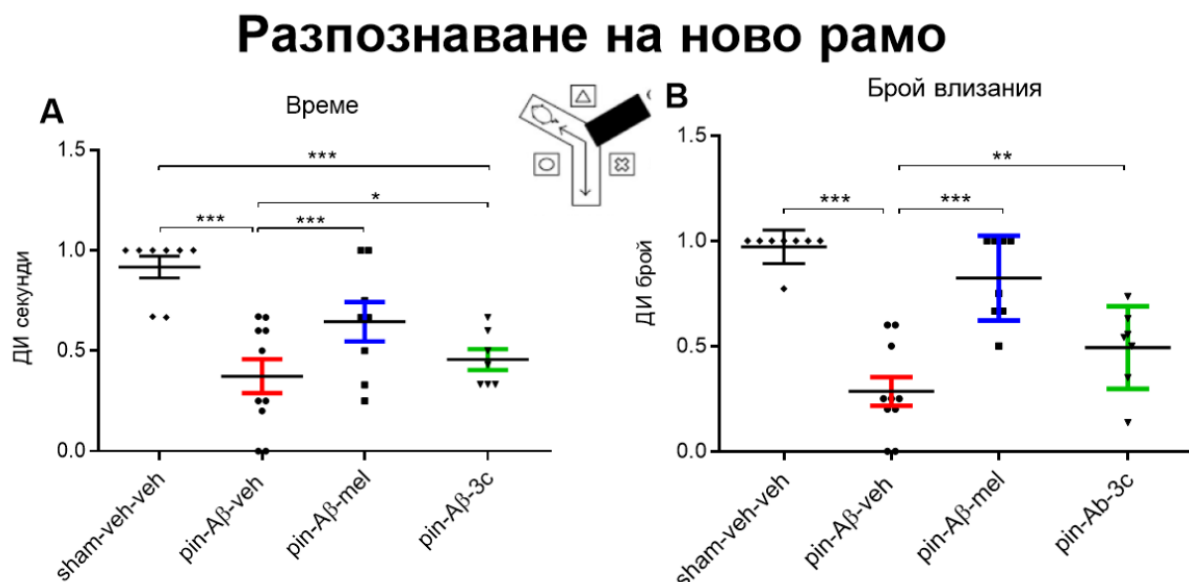


Фигура 10 Графично представяне на резултатите от поведенчески тест за разпознаване на нова локация на обект, изразени в DI.

## РЕЗУЛТАТИ

### 1.1.4. Тест за разпознаване на непознато рамо (Y-лабиринт протокол 2)

Във вторият протокол на Y-лабиринта беше оценена краткосрочната пространствена памет (фиг. 11). Патологичният модел се характеризираше със значително понижение на ДИ и по двата анализирани параметъра спрямо контролната група ( $***p<0.001$  за време и  $***p<0.001$  брой влизания pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh). Групите на третираните с **3с** и мелатонин показаха значително по-голям брой влизания в непознатото рамо в сравнение с моделната група ( $***p<0.001$  pin-A $\beta_{1-42}$ -mel и  $**p<0.01$  pin-A $\beta_{1-42}$ -3с спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh). Относно времето прекарано в непознатото рамо, референтната група демонстрира поведение, сходно с това на контролната група ( $**p<0.01$  pin-A $\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh), докато групата, третирана с хибридно съединение, показва значимо подобрение спрямо моделната група (фиг. 11 А, В), въпреки наличието на статистическа разлика спрямо контролната група ( $***p<0.001$  pin-A $\beta_{1-42}$ -3с спрямо sham-veh-veh и  $*p<0.05$  спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh) (фиг. 11А).

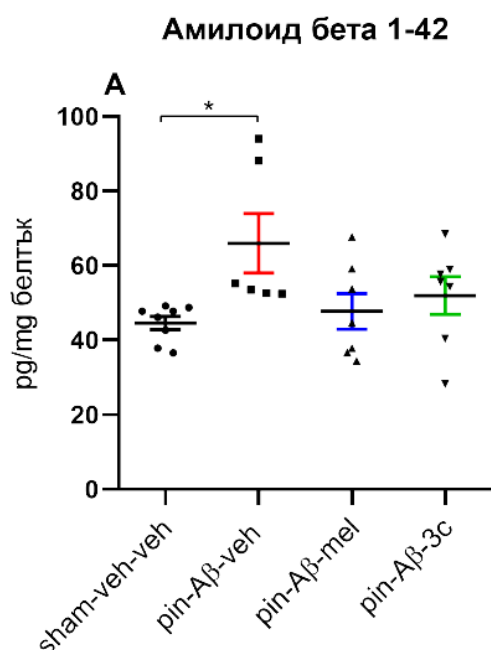


Фигура 11 Графично представяне на резултатите от тест за разпознаване на ново рамо, където стойностите са оценени чрез DI, определящ се посредством (А) времето на престой и (В) брой влизания в непознатото рамо.

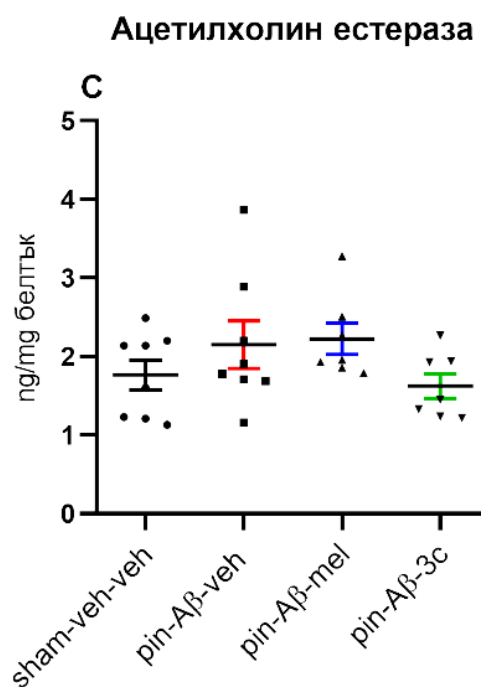
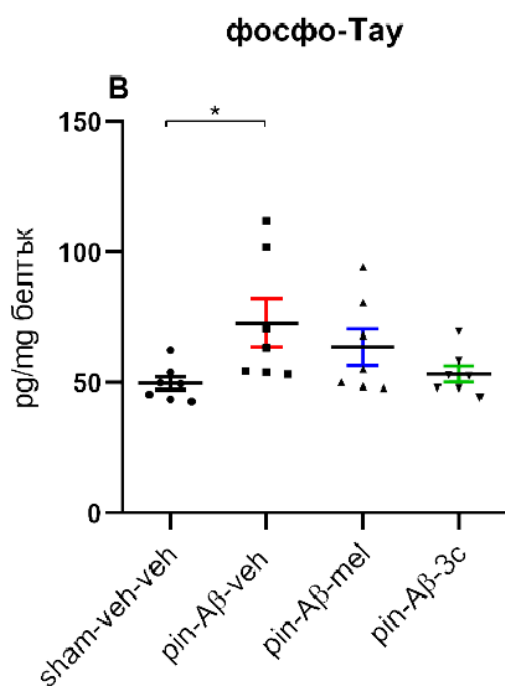
# РЕЗУЛТАТИ

1.2. Ефекти на хибридното съединение **3c** върху молекулярни маркери, свързани с патологичните процеси в хипокамп при *in vivo* комбиниран модел на мелатонинов дефицит и БА

## Хипокамп



Фигура 12 Графично представяне на трите основни молекулярни маркера в хипокампална тъкан, с които се характеризира патологията на БА. (A) Амилоид бета1-42; (B) p-Тау-протеин (C) Ацетилхолинестераза.



## РЕЗУЛТАТИ

Изхождайки от спецификата на експерименталният модел първоначално бяха изследвани ефектите на хибридно съединение **3с** върху експресията на три основни маркера, имащи отношение към патогенезата на БА, включително  $A\beta_{1-42}$  (12, А), p-Tau протеин (12, В) и нива на ацетилхолин естераза (12, С) от хипокампални хомогенати.

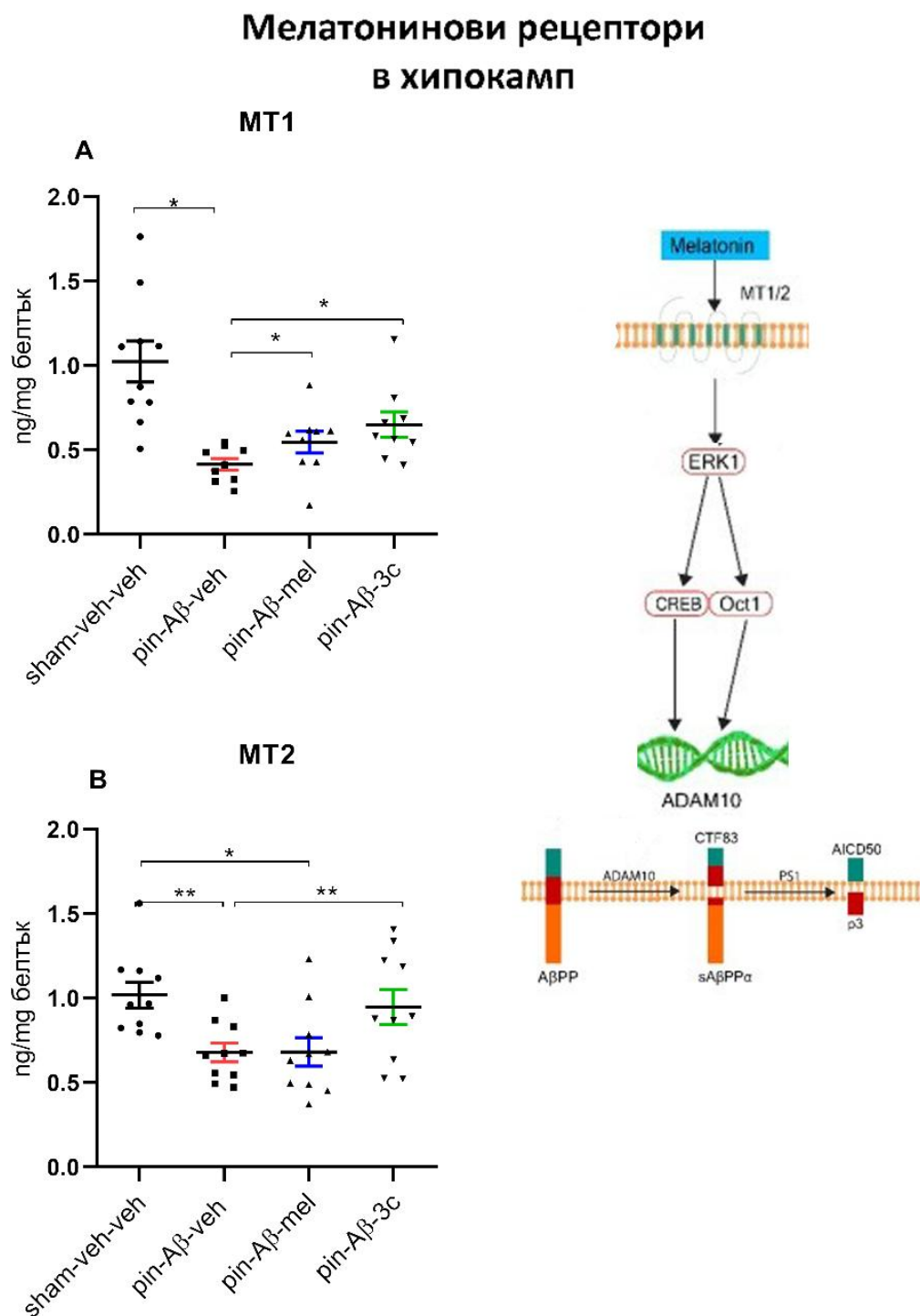
При двата ключови маркера, свързани с натрупване на олигопептидни фибрили, се установи ясно изразена статистическа значимост между моделната и контролната (\* $p < 0.05$ : sham-veh-veh спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh) групи, което потвърждава патологичния ефект на ицв инфузията. По отношение на показателя, отразяващ нивата на ацетилхолинестераза, не бяха установени статистически значими разлики между нито една от изследваните групи (фигура 12С).

### 1.3. Изследване ефектите на хибридно вещество **3с**, спрямо маркери, участващи в неамилоидогенния сигнален път опосредстван от хормона мелатонин в хипокамп при *in vivo* комбиниран модел на мелатонинов дефицит и БА

Базирайки се на предходните данни, които показват сходството между **3с** и мелатонин както в *in silico*, така и в *in vitro* и *in vivo* проучвания [15–18], фокусът на биохимичните изследвания беше насочен към изследване ефектите на **3с** върху маркери, участващи в неамилоидогенния сигнален път в хипокамп. Ендогенния мелатонин осъществява неврпротекторно действие върху акумулирането на токсичния олигопептид  $A\beta_{1-42}$  чрез превръщането на амилоидния прекурсор (APP) в разтворим фрагмент, по два основни начина: рецепторен и интрацелуларен. Бяха анализирани няколко ключови молекулярни маркери, участващи в сигналния път, както следва: мелатонинови рецептори (MT1 и

## РЕЗУЛТАТИ

MT2), деацетилазния ензим SIRT1, активните (фосфолирани) форми на pERK и pCREB.



Фигура 13 Графично представяне ефекта на третиране с мелатонин и 3с върху двата подтипа мелатонинови рецептора MT1 (A) и MT2 (B) в хомогенат от хипокампа на тъкан.

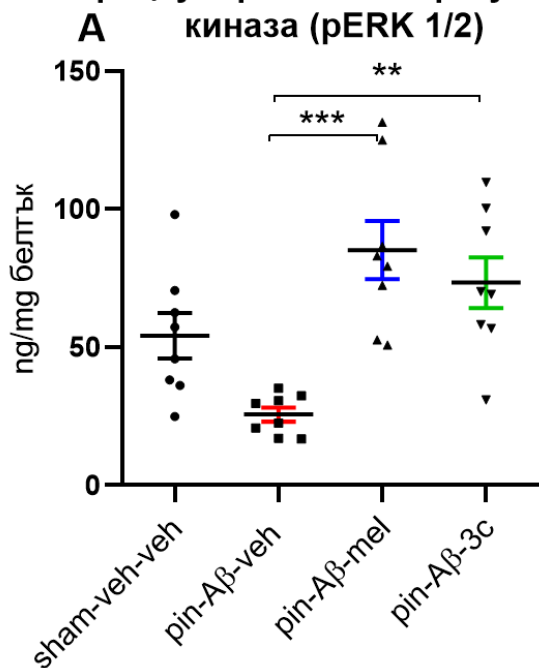
## РЕЗУЛТАТИ

Моделната група демонстрира ясно изразен патологичен ефект проявен като понижена експресия на двата мелатонинови рецептори, спрямо контролата, както за подтипа MT1, така и за подтипа MT2 (\* $p < 0.05$  за MT1; \*\* $p < 0.01$  за MT2; sham-veh-veh спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh) (Фиг 13 А и В). Третирането с мелатонин и **3с** доведе до възстановяване нивата на MT1 рецепторния подтип до до стойности, съпоставими с тези на контролната група (\* $p < 0.05$  за  $A\beta_{1-42}$ -veh спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -mel и pin- $A\beta_{1-42}$ -3с). Интересно е, че при рецепторния подтип MT2 значимо повишение се наблюдава единствено в групата, третирана с хибридно съединение **3с** (\*\* $p < 0.01$  за pin- $A\beta_{1-42}$ -3с спрямо  $A\beta_{1-42}$ -veh), докато животните инжектирани с мелатонин, не показват съществен ефект по отношение на MT2 рецепторния подтип спрямо патологичния модел (pin- $A\beta_{1-42}$ -veh).

Аналогично на литературните данни и поведенческите резултати, анализът на ключовите сигнални молекули в хипокамп (фиг. 13 и 14) показва, че третирането с мелатонин води до корекция на понижените нива на транскрипционния фактор и сигнал-регулиращата киназа, установени в моделната група, третирана с разтворител (\*\* $p < 0.001$  pin- $A\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh). По отношение експресията на Сиртуин 1 (фиг. 14 С), групата с референтното вещество показва най-високи стойности в сравнение с всички останали групи (\*\* $p < 0.001$  за pin- $A\beta_{1-42}$ -veh; и \*\* $p < 0.01$  за sham-veh-veh: спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -mel). Моделните животни, третирани с хибридно съединение **3с**, показаха резултати, сходни с тези на мелатонина, като отново бе регистрирано значимо повишение на двата ключови маркера, pERK и pCREB (\*\* $p = 0.01$  за pERK; и \* $p < 0.05$  за pCREB; pin- $A\beta_{1-42}$ -3с спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh), свързани с индуциране на неамилоидогенния сигнален път (фиг 14 А и В). Нивата на SIRT1 в тази група бяха близки до контролната група (sham-veh-veh).

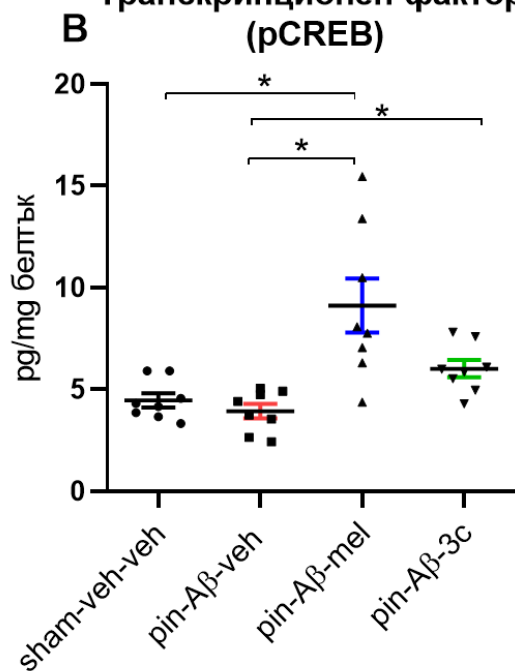
## Сигнални молекули в хипокамп

### Екстрацеуларна сигнал-регулираща киназа (pERK 1/2)

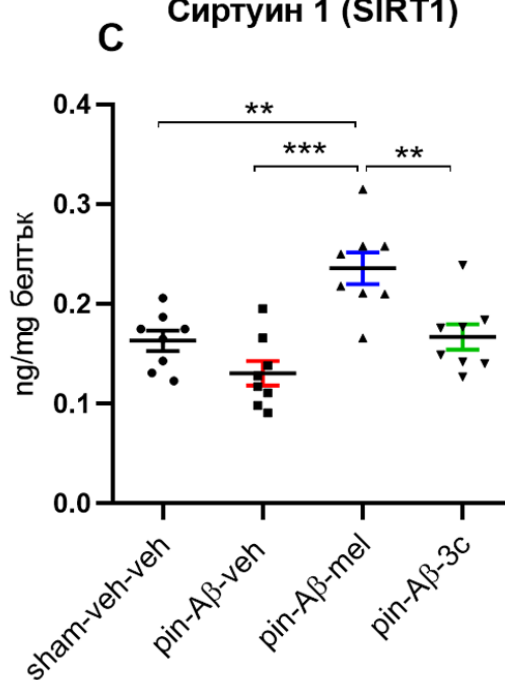


Фигура 14 Графично представяне на резултати от биохимични изследвания на неамилоидогенния сигнален път свързан с мелатонин в хипокампални хомогенати, определени по метода ELISA, екстрацеуларна сигнал-регулираща киназа pERK1/2(A); транскрипционен фактор, pCREB (B), Сиртуин 1, SIRT1 (C).

### Транскрипционен фактор (pCREB)



### Сиртуин 1 (SIRT1)



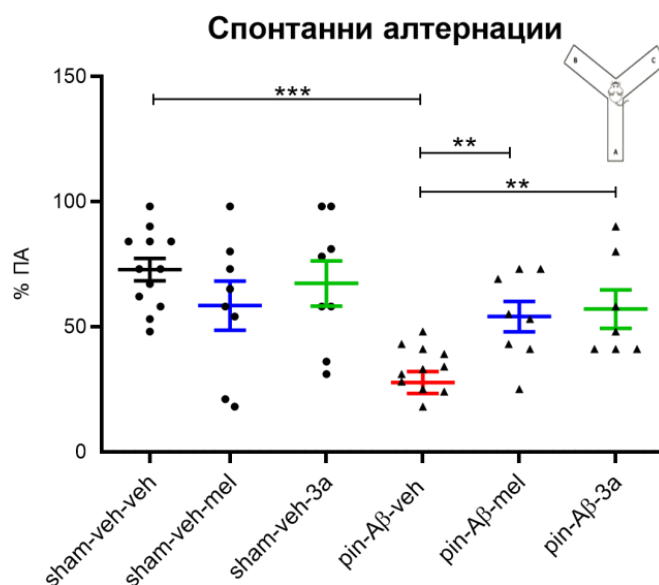
## 2. Кохорта II

### 2.1. Проучване ефекта на хибридно съединение **3a** върху оперативната и краткосрочна разпознавателна памет при *in vivo* комбиниран модел на мелатонинов дефицит и БА

#### 2.1.1. Тест за определяне на SAB (Y-лабиринт протокол 1)

Третирането със съединението **3a** и мелатонин в контролните групи (sham-veh-**3a** и sham-veh-mel) не показва статистически значим ефект спрямо контролата, третирана с разтворител (sham-veh-veh). Бе наблюдаван ясно изразен паметов дефицит при патологичния модел с разтворител спрямо контролната група ( $***p < 0.001$  pin- $A\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh). Моделните животни третирани с мелатонин и **3a** се характеризираха с подобрени когнитивни функции спрямо моделната група по отношение на работната памет ( $**p = 0.005$  за pin- $A\beta_{1-42}$ -mel и  $**p = 0.002$  за pin- $A\beta_{1-42}$ -**3a** спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh). Третирането със съединението **3a**, подобно на референцията мелатонин, оказва благоприятен ефект върху SAB спрямо моделната група, коригирайки този поведенчески показател до нива близки на тези на контролната група (sham-veh-veh) (фиг. 15).

# РЕЗУЛТАТИ



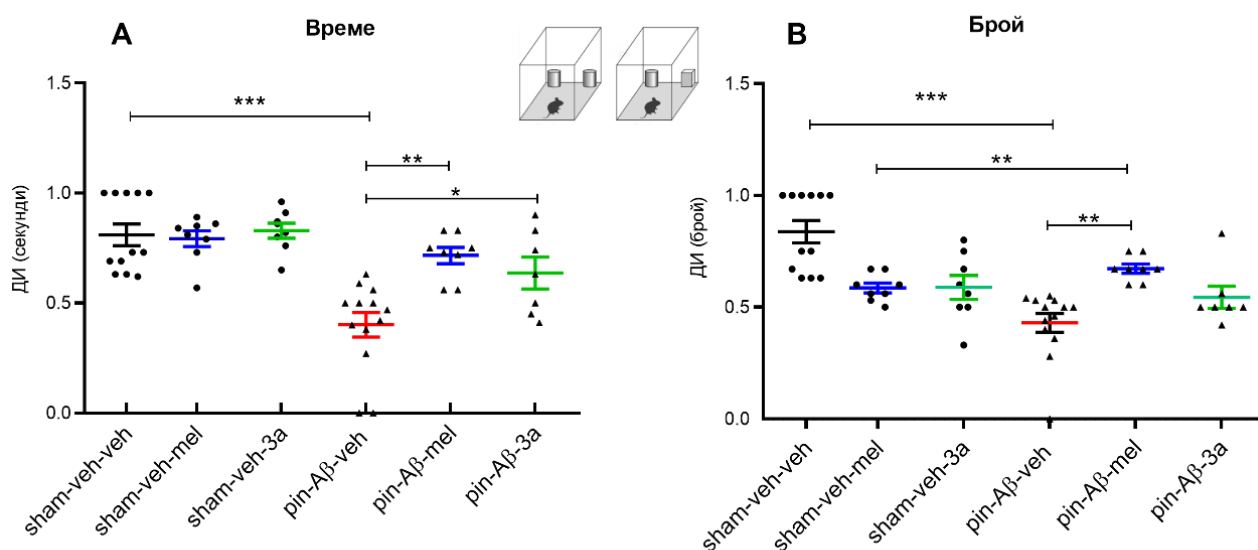
Фигура 15 Графично представени резултати на процент правилни алтернации (%ПА) изпълнени чрез първи протокол на Y-лабиринт.

## 2.1.2. Тест за разпознаване на нов обект (ORT)

При оценката на краткосрочна памет, свързана с разпознаване на нов обект се забелязва ясно изразен патологичен ефект при моделната група както при времето на опознаване, така и при броя интеракции с непознатия предмет сравнен с контролната група ( $***p < 0.001$  за време; и  $***p < 0.001$  за брой; pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh), която демонстрира по-голям интерес (фиг. 16 А и В). Не се забелязва ефект на веществата мелатонин и **3a** (sham-veh-3a и sham-veh-mel) като техните резултати на контролно ниво и при двата отчетени параметъра. При моделните групи, третирани с референтното вещество мелатонин, се установи статистически значимо подобрение и при двата параметъра, спрямо моделната група ( $**p = 0.003$  за време; и  $**p = 0.002$  за брой; pin-A $\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh). Субхроничното третиране на моделната група третирана с **3a** оказва статистически значим ефект само върху времето на изследване на новия обект ( $*p = 0.021$  pin-A $\beta_{1-42}$ -3a спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh) (фиг. 16 А).

# РЕЗУЛТАТИ

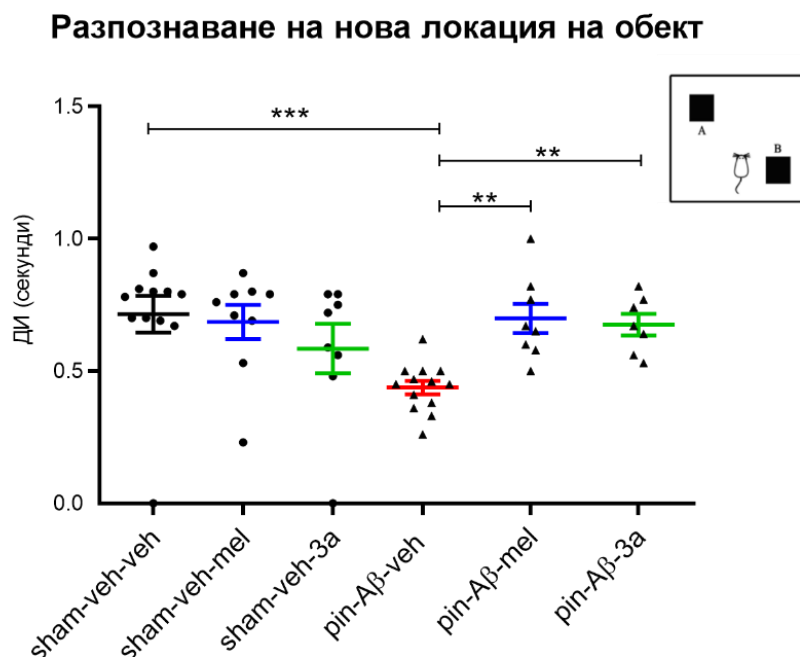
## Разпознаване на нов обект



Фигура 16 Графично представяне на резултати от поведенчески тест за разпознаване на непознат обект, оценени в два параметъра чрез дискриминационен индекс (ДИ): (А) време на изследване на новия обект спрямо познатия обект (В) брой интеракции с новия обект спрямо познатия обект.

### 2.1.3. Тест за разпознаване на непознатата локация на обект (OLT)

Подобно на резултатите от ORT, при теста за оценка на краткосрочната пространствена памет се наблюдава ясна паметова дисфункция в моделната група, изразена чрез по-кратко време за интеракция с обекта в новата локация, спрямо контролната група ( $***p < 0.001$  pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh) (фиг. 17). Не се наблюдава ефект на двете вещества в контролните групи (sham-veh-3a и sham-veh-mel). Третирането на моделните групи с **3a** и мелатонин (pin-A $\beta_{1-42}$ -3a и pin-A $\beta_{1-42}$ -mel) оказва благоприятно влияние и коригира когнитивните дефицити, отчетени при моделната група ( $**p = 0.0021$  за pin-A $\beta_{1-42}$ -3a и  $**p = 0.003$  pin-A $\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh).



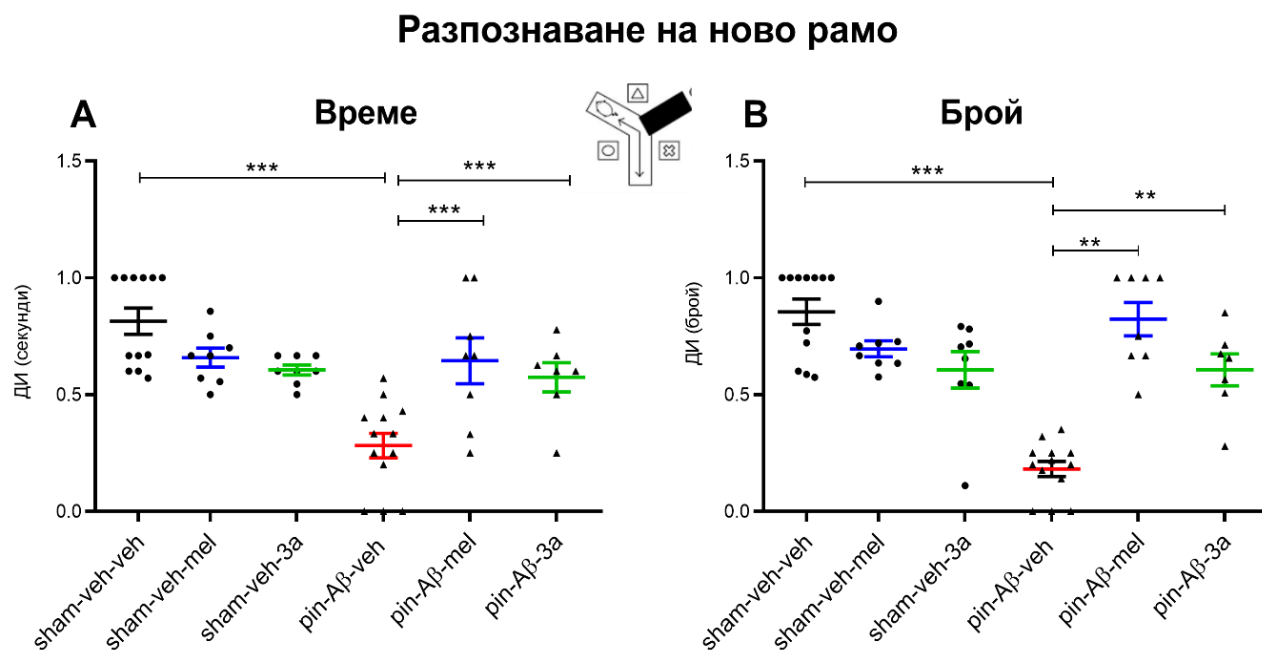
Фигура 17 Графично представяне на резултати свързани с ефекта на **3a** върху краткосрочната пространствена памет, оценени чрез тест за отчитане на време за интеракции с нова локация на обект спрямо позната локация /секунди/, отчетена като DI.

#### 2.1.4. Тест за разпознаване на непознато рамо (Y-лабиринт протокол 2).

Последният тест за краткосрочна пространствена памет, проведен в Y-лабиринт показва статистически значими разлики на DI за моделната група спрямо контролната група, отчетен чрез два изследвани параметъра: време за изследване и брой влизания в непознатото рамо ( $***p < 0.001$  за време; и  $***p < 0.001$  за брой; pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh) (фиг. 18 A и B). Подобно на останалите поведенчески експерименти, третирането с позитивната контрола – мелатонин и хибридно вещество **3a** оказва значително подобрене в паметовите процеси спрямо моделната група ( $***p = 0.001$  за време; и  $**p = 0.009$  за брой; при група pin-A $\beta_{1-42}$ -mel;  $***p = 0.001$  за време; и  $**p = 0.003$  за брой при група pin-A $\beta_{1-42}$ -3a спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh). При контролните групи (sham-veh-

## РЕЗУЛТАТИ

3a и sham-veh-mel) не бяха наблюдавани ефекти на веществата и техните стойности останаха на контролно ниво.



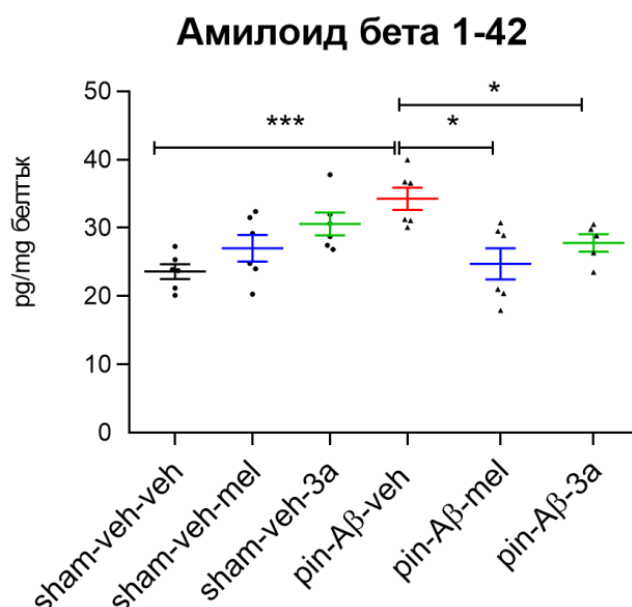
Фигура 18 Графично представяне на резултати свързани с ефекта на **3a** върху краткосрочната пространствена памет, оценени чрез втори протокол на Y-лабиринт, изразени в DI на време за влизания /секунди/ (A) и брой на влизания в новото рамо (B).

2.2. Ефект на вещество с хибридно действие **3a** при модел на интрацеребровентрикуларна инфузия на невротоксин  $A\beta_{1-42}$  с мелатонинов дефицит върху основния БА-асоцииран молекулярен маркер свързан с паметовите и когнитивни дефицити в хипокамп.

Невротоксичния олигопептид  $A\beta_{1-42}$  (Фиг. 19) беше определен по метода ELISA. Моделната група показва статистически значимо повишена експресия на маркера спрямо контролната група отчетена в хомогенат от хипокамп ( $***p < 0.001$  pin- $A\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh). В съответствие с литературните данни, моделните животни третирани с мелатонин показаха понижена експресия на  $A\beta_{1-42}$  спрямо животните третирани с

## РЕЗУЛТАТИ

разтворител (\* $p=0.017$  pin- $A\beta_{1-42}$ -mel спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh). Третирането с **3a** в моделната група показва стойности близки до тези на мелатонина (pin- $A\beta_{1-42}$ -mel) и се характеризира със значителна редукция спрямо патологичния модел (\* $p=0.0146$  pin- $A\beta_{1-42}$ -3a спрямо pin- $A\beta_{1-42}$ -veh). В контролните групи третирани с двете вещества, мелатонин и **3a**, съответно (sham-veh-mel и sham-veh-3a) не бяха отчетени статистически значими разлики спрямо контролната група (sham-veh-veh).



Фигура 19 Графично представяне на експресията на невротоксина  $A\beta_{1-42}$  в хипокампадна тъкан при контролни групи, третирани с разтворител, мелатонин и 3a, съответно и моделни групи, третирани с разтворител, мелатонин и 3a, съответно.

### 2.3. Ефект на хибридното съединение **3a** върху основните маркери за оксидативен стрес при *in vivo* комбиниран модел на мелатонинов дефицит и болест на Алцхаймер

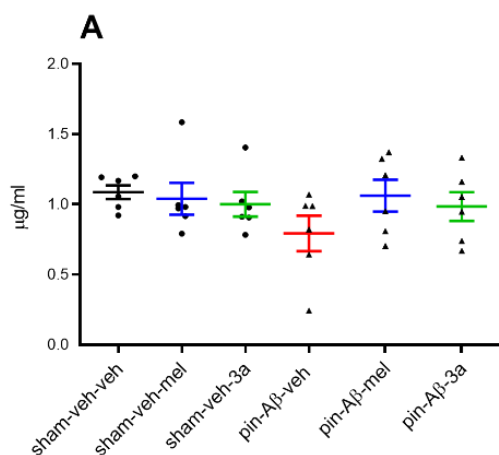
Бяха изследвани три основни маркера, определящи оксидативния статус в хипокампадни хомогенати: GSH, SOD1 и MDA при контролни групи третирани с разтворител,

## РЕЗУЛТАТИ

мелатонин и **3a**, съответно, и моделни групи, третирани по аналогичен начин (фигура 20, А, В и С). Не бяха отчетени различия в нивата на GSH показаха тенденция, но в нито една група не се установи статистическа значимост. При експресиите на SOD1 и MDA се забелязва ясно изразена значимост между модела и контролната група (\* $p=0.023$  pin-A $\beta_{1-42}$ -veh спрямо sham-veh-veh). При пробите на моделни животни третирани с мелатонин и **3a** се наблюдава значителна корекция на SOD1 и MDA спрямо хибридният модел (\*\* $p=0.0067$  за SOD1 и \* $p=0.014$  за MDA; при pin-A $\beta_{1-42}$ -mel и \*\* $p=0.004$  за SOD1; и \* $p=0.036$  за MDA при pin-A $\beta_{1-42}$ -3a спрямо pin-A $\beta_{1-42}$ -veh).

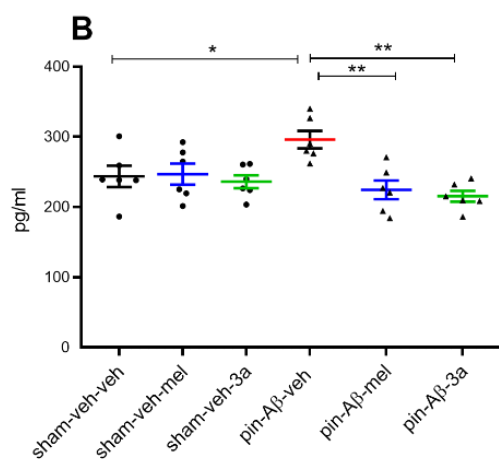
### Оксидативен статус в хипокамп

#### Глутатион (GSH)

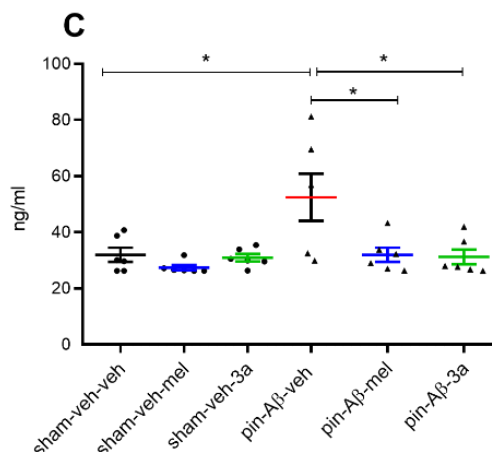


Фигура 20. Графично представяне на основните маркери за оксидативен стрес: глутатион (GSH) (A), супероксид дисмутаза 1 (SOD1) (B), малоналдеhid (MDA) (C) в хипокампални хомогенати, определени по метода ELISA.

#### Супероксид дисмутаза 1 (SOD1)



#### Малоналдеhid (MDA)



Изборът на хибридният модел пинеалектомия + icv инфузия на  $A\beta_{1-42}$  се базира на предходни наши данни, показващи, че комбинацията възпроизвежда по-успешно ключови аспекти на предклиничната и ранната клинична патогенеза на БА в сравнение със самостоятелно прилагане на една от двете процедури [19,20]. Комбинираният модел индуцира едновременно значим когнитивен дефицит, повишена тревожност и изразено оксидативно увреждане в хипокампа и фронталния кортекс. Това е съпроводено с редуцирана антиоксидантна защита, изразяваща се в намалени нива на ендогенните антиоксиданти GSH и SOD1, както и повишена липидна пероксидация оценена чрез MDA. Посочените характеристики правят модела особено подходящ за изследване на потенциални неврозащитни стратегии, тъй като позволяват едновременно проследяване на ефектите върху поведенческите прояви и ключови молекулярни маркери на БА в условия, близки до предклиничния стадий на заболяването, когато мелатониновият дефицит е вече налице, но когнитивните нарушения са в начален етап. В този контекст, в настоящето изследване бе осъществена модификация на хибридният модел, свързана с промяна на времевия интервал между двете хирургични манипулации (пинеалектомия и icv инфузия) в рамките на 7 дни. Тази корекция осигури оптимално развитие на модела и по-голямо сходство с предклиничната картина на заболяването [21].

Това заключение се подкрепя от резултатите от поведенческите тестове, при които, в сравнение с контролната група, моделната се характеризира с паметови дефицити и грешки в работната памет. И при двете кохорти се регистрират статистически значими промени в експресията на ключовия маркер за БА -  $A\beta_{1-42}$ , а в биохимичните резултати на Кохорта I, където са изследвани нивата на p-Tau протеин също се наблюдава неговата

индукция, което потвърждава развитието на характерните за заболяването молекулярни промени.

Настоящото изследване потвърждава съществените предимства на използвания модел спрямо класическите трансгенни миши модели на БА [22]. От една страна, той осигурява по-близка физиологична аналогия с човешкия организъм, позволявайки прилагането на директни неврохирургични интервенции. Въпреки инвазивният подход, плъшите модели предлагат по-прецизна оценка на паметовите и когнитивни увреждания чрез систематизирани поведенчески тестове, които не могат да бъдат адекватно приложени при по-дребни гризачи. От друга страна, моделът се характеризира с бързо настъпване на патологичните изменения – когнитивни дефицити, оксидативен стрес и циркадни аномалии, които могат да се отчетат в рамките на една седмица. За разлика от него, трансгенните модели, макар и ценни за изясняване на молекулярните механизми при фамилна форма на заболяването, се характеризират с бавно развитие на симптоматиката и ограничена приложимост при изследване на спорадичната форма на БА, която представлява над 95% от случаите при хората. В този контекст, хибридният модел демонстрира висока транслационна приложимост и експериментална гъвкавост, като предоставя платформа за тестване на нови мултимоделни терапии, насочени към комплексната патофизиология на заболяването [23,24].

## 1. Кохорта I

### 1.1. Ефекти на хибридното съединение **3с** върху краткосрочната пространствена, оперативна и разпознавателна памет

Получените резултати показват, че съединението **3с** демонстрира изразен невропротективен ефект при модел на БА, индуциран чрез комбинирана пинеалектомия

## ОБСЪЖДАНЕ

и интравентрикуларна инфузия на  $A\beta_{1-42}$ . При Y-лабиринт – протокол 1, който служи за оценка на пространствената работна памет, третирането на животните с **3с** показва значително подобрене на процента правилни алтернации и възстановяване на % SAV до нива, сравними с тези на позитивната контрола мелатонин, което е в подкрепа на хипотезата за потенциала на разработваните хибридни съединения в ефективната модулация на синаптичната пластичност[25,26]. Оценката на разпознавателната памет, която зависи от взаимодействието между хипокамп и периринална кора [27]бе осъществено чрез прилагане на теста за разпознаване на обект. Резултатите ни показаха, че подобно на позитивната контрола мелатонин, хибридното съединение **3с** частично възстановява паметовите нарушения при модела. Този ефект съответства на данни за мелатонина и негови аналози, които подобряват както времето, така и броя на взаимодействията с нов обект чрез антиоксидантни и рецепторно-медирирани механизми [28]. За оценка на хипокамп-зависимата пространствена краткосрочна памет бяха приложен два теста, OLT и втори протокол за Y-лабиринта с идея за валидиране на комбинирания модел, от една страна, и за оценка ефикасността на хибридното съединение **3с** върху паметовия дефицит свързан с разпознаване на локация на обект [29]. Резултатите ни показаха, че субхроничното третиране с **3с** има благоприятен ефект върху паметовия дефицит индуциран при комбинирания модел на БА, който е съизмерим с този на позитивната контрола мелатонин. Тези данни потвърждават, че **3с** упражнява стабилизиращ ефект върху процесите на пространствена краткосрочна памет, нарушени от  $A\beta$ -индуцираната невротоксичност [30,31][32,33].

## ОБСЪЖДАНЕ

Тези ефекти вероятно се дължат на комбинираното въздействие на **Зс** върху холинергичната система, антиоксидантните механизми и мелатониновите рецепторно-медиирани сигнални пътища [18,34].

Въпреки че не всички ефекти достигат пълното възстановяване до контролни нива, обобщената поведенческа картина ясно сочи, че **Зс** има потенциал на мощен мултитерапевтичен агент с действие асоцииращо се с превенция и корекция на когнитивни дефицити при БА, включително краткосрочната работна и пространствена памет.

### 1.2. Ефект на **Зс** върху молекулярните маркери за БА и неамилоидогенната мелатонин-асоциирана сигнална каскада.

Биохимичните изследвания на Кохорта I показва, че патологичния хибриден модел, води до значимо повишаване на два ключови маркера, свързани с патогенезата на БА:  $A\beta_{1-42}$  и p-Тау протеин.

При животните, третирани с **Зс** и мелатонин, нивата на  $A\beta_{1-42}$  и p-Тау бяха отчетливо редуцирани в сравнение с моделната група и се доближаваха до тези на контролните животни. Това показва, че приложението на **Зс**, подобно на мелатонин, оказва стабилизиращ ефект върху основните патогенетични маркери на заболяването и може да ограничи прогресията на амилоидната и тау-патологията в използвания експериментален модел.

По отношение на третия маркер, експресия на ацетилхолинестераза, който също отразява патогенезата на БА, резултатите от изследването ни показаха, че приложения хибриден модел на пинеалектомия+ицв  $A\beta_{1-42}$  не е оптимален за отчитане на този важен

## ОБСЪЖДАНЕ

маркер на заболяването. Лимитиращ фактор на проучването ни, е че бяха анализирани нивата на ензима без да се проследят неговите кинетични характеристики. Това налага провеждането на допълнителни изследвания, което налага бъдещи допълнителни изследвания в тази насока при валидиране на модела, което е от ключово значение при оценка ефикасността на разработваните хибридни молекули с наличие на донепезилоподобен фармакофор, каквото е структурата и на **3c**. Наблюдаваната тенденция за частично повишение на нивата на AChE в моделната група спрямо контролната, както и слабото понижение при третиране с **3c** и мелатонин предполага няколко възможни обяснения:

- Потенциален ефект на **3c** върху активността на AChE, при който молекулата инхибира ензимното действие, без да променя количествено нивата в хипокампадна тъкан - подобно на своя аналог Донепезил [35,36]
- Краткотрайна активация на холинергичната дисфункция в използвания модел, която не позволява надеждно регистриране на промени в нивата на AChE;
- Ограничена *in vivo* стабилност или бионаличност на AChE-инхибиращата част на **3c**, което следва да бъде предмет на последващи фармакокинетични изследвания.

В тази връзка, отсъствието на отчетлив ефект върху AChE насочва вниманието към потенциалния нехолинергичен и неамилоидогенен профил на съединение **3c**, който се откроява по-ясно в данните за експресия на мелатониновите рецептори и техните сигнални медиатори.

Следващите резултати проследяват именно мелатонин-индуцирания неамилоидогенен път и показват, че съединението **3c** оказва съществен ефект върху сигнализацията

## ОБСЪЖДАНЕ

отговорна за неутрализирането на токсичния олигопептид  $A\beta_{1-42}$  чрез насочване метаболизма на амилоидния прекурсор към неамилоидогенен път медиран от мелатониновите рецептори MT1 и MT2. В моделната група (pin- $A\beta_{1-42}$ -veh) се наблюдава значително понижение на експресията на MT1 и MT2, съпроводено с редукция на низходящите сигнални медиатори pERK1/2 и pCREB. Тези изменения са в съответствие с предходни изследвания, които съобщават за редуцирана плътност на MT2 рецепторите в хипокамп на пациенти с БА, както и за нарушена рецепторна функционалност [37,38]

Приложението на **3c** води до нормализиране хипокампалната експресия на MT1, резултат сходен с този на мелатонина. За разлика от позитивната контрола, хибридно съединение оказва стимулиращ ефект върху експресията MT2 като се наблюдава значително повишение на този рецепторен тип. Тези рецептори са особено важни за регулацията на синаптичната пластичност и когнитивните функции[39], което корелира с показаните благотворни ефекти на **3c** върху паметовите функции при използвания в изследването експериментален модел на БА.

Известно е, че ендогенния мелатонин активира ERK/CREB сигнализация чрез G-протеин-зависима рецепторна стимулация [40]. CREB се явява ключов транскрипционен фактор, контролиращ експресията на гени, като по този начин играе централна роля в когнитивните процеси.[18,41].

Низходящо по каскадата, повишените нива на pERK1/2 и pCREB при третирани животни показват, че **3c** активира основния MT1/MT2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  CREB път, който регулира транскрипционни програми, свързани с клетъчна адаптация и паметови процеси [18,41].

Тези резултати са в подкрепа на хипотезата, че благоприятните ефекти на **3c** върхукогнитивните дефицити се опосредстват от стимулиране на неамилоидогенния

## ОБСЪЖДАНЕ

сигнален път опосредстван от MT1/MT2 рецепторна активация, който се предполага, че е компрометиран при БА [18].

За разлика от позитивната контрола мелатонин, която предизвиква статистическо значимо увеличение на хипокампаалните нива на SIRT1, **3с** демонстрира ограничено въздействие върху този цитоплазмен сигнален маркер. SIRT1 е NAD<sup>+</sup>-зависима деацетилаза, която играе важна роля в невроналната устойчивост и дългосрочната регулация на транскрипцията [42]. Следователно профилът на действие на **3с** изглежда по-селективно насочен към рецепторно-зависимата ERK/CREB ос, докато мелатонин активира и по-широки епигенетични механизми за активиране на неамилодогенния сигнален път чрез SIRT1 [43]. Обобщено, проведеното изследване показва, че хибридното съединение **3с** упражнява **значим невропротективен ефект** при модел на БА, индуциран чрез комбинирана **пинеалектомия и ицв инфузия на A $\beta$ <sub>1-42</sub>**. Поведенческите тестове за краткосрочна, оперативна пространствена и разпознавателна памет демонстрират, че **3с** подобрява когнитивните дефицити, като ефектът е сравним с този на позитивната контрола **мелатонин**, което потвърждава способността на съединението да стабилизира процесите на **паметова консолидация, пространствена ориентация и разпознаване на обекти**.

На молекулярно ниво, третиране с **3с** нормализира хипокампаалната експресия на **MT1** и значително повишава нивата на **MT2** рецепторите, ключови за регулацията на **синаптичната пластичност и когнитивните функции**. Съединението активира низходящата **ERK1/2–CREB** сигнална ос, която е критична за дългосрочното потенциране и консолидацията на паметта, като по този начин възстановява неамилодогенния мелатонинов сигнален път. Въпреки че моделът и прилаганият

## ОБСЪЖДАНЕ

подход не позволяват надеждна оценка на нивата на **ацетилхолинестераза**, наблюдаваните тенденции показват, че **3с** може да упражнява нехолинергичен и неамилоидогенен МТ-рецептор-медиран профил, като фокусът се измества към мелатониновата система.

## 2. Кохорта II

### 2.1.Ефект на хибридно вещество **3а** върху краткосрочна пространствена, оперативна и разпознавателна памет.

При оценка на процента SAB, отчетени в първи протокол на Y-лабиринт бе наблюдаван коригиращ ефект при субхронично третиране със съединението **3а** върху оперативната памет, нарушена при хибридният модел пинеалектомия+ **ицвAβ<sub>1-42</sub>**. Изхождайки от поведението, сходно с това на животните третирани с мелатонин, може да се предположи, че **3а** оказва благотворно влияние върху процесите на синаптична пластичност, нарушени от Aβ-индуцираната токсичност [97,98].

В теста за разпознаване на нов обект, целящ оценка на краткосрочната разпознавателна памет, се установи ясно разграничение между двата изследвани показателя. При DI „брой“ не се наблюдава статистически значима разлика между моделната и **3а**-групата, което показва ограничено въздействие върху честотата на взаимодействия с новия обект. За сметка на това, при DI „време“ животните, третирани с **3а**, демонстрират значимо повишение на времето, отделено за опознаване на новия обект, спрямо моделната група. Този ефект свидетелства за частично възстановяване на вниманието и процесите на разпознаване, който е сравним с този на мелатонин[27,46]. При теста OLT, който дава оценка на хипокамп-зависимата пространствена памет бе наблюдаван ясно изразен ефект

## ОБСЪЖДАНЕ

на **3a**, който възстановява DI. От настоящите резултати, може да се заключи, че веществото модулира хипокамп-зависимите процеси на кодиране и консолидация на краткосрочна пространствена памет. Потвърждение на това предположение е установения положителен ефект моделната група третирана с **3a**, сходен с този на мелатонина, върху краткосрочната пространствена памет, изследвана с втория протокол на Y-лабиринт. Този резултат показва, че **3a** упражнява стабилен ефект върху оперативната памет и детекцията на новост, съпоставим с този на мелатонин[47,48].

При контролните животни третирани с **3a** не бе регистриран негативен ефект и отчетените стойности са близки до чистите контроли, което предполага, че съединението няма странични ефекти при *in vivo* изследването. В заключение, поведенческите резултати от Кохорта II показват, че съединението **3a** проявява изразен протективен ефект, сравним с този на позитивната контрола мелатонин по отношение на паметовите дефицити характерни за комбинирания модел на пинеалектомия+ ицвA $\beta_{1-42}$ , който създава предпоставки за изследване на антиоксидантния му профил.

### 2.2.Ефект на хибридно вещество **3a** върху молекулярния маркер за БА и оксидативния статус в хипокамп.

При третираните със съединение **3a** и мелатонин животни се наблюдава значимо понижаване на A $\beta_{1-42}$  спрямо моделната група, което свидетелства за антиамилоидна активност и потенциална модулация на APP-протеолизата. Тези резултати съответстват на предишни данни, че мелатонин и негови производни могат да ограничават амилоидната агрегация чрез активиране на неамилоидогенния сигнален път [85,99].

## ОБСЪЖДАНЕ

Спрямо основните оксидативни маркери, при основния ендегенен антиоксидант, GSH, който е ключов регулатор на редокс-хомеостазата[49], се отчете тенденция към понижаване в моделната група и умерено възстановяване при третираните с **3a** и мелатонин животни. Въпреки това, разликите не достигат статистическа значимост, което предполага частично, но не категорично възстановяване на редокс-баланса.

Експресията на SOD1, ензим показателен за антиоксидантната защита, бе значимо редуцирана в моделната група спрямо контролните, което потвърждава наличието на A $\beta$ -индуциран оксидативен стрес [50]. При третирането с **3a** и мелатонин се установи статистически значимо повишаване нивата на антиоксидантния ензим в хипокампадна тъкан при моделната група.

Третирането с **3a** и мелатонин доведе до значимо понижаване на MDA спрямо моделната група, като стойностите също се различават статистически от контролните. Това демонстрира ефективността на **3a** в ограничаването на липидната пероксидация и предпазването на клетъчните мембрани от A $\beta$ -индуцирано увреждане.

На базата на получените резултати, може да предположим, че субхроничното третиране с **3a** има антиамилоиден ефект чрез възстановяване на нарушения баланс между образуваните при метаболизма свободни радикали и ендегенните антиоксиданти, което води до повишен оксидативен стрес в хипокамп и увреждания в сигналните пътища с протективно действие спрямо натрупването на токсичния олигопептид A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Резултатите в контролните групи показват, че веществото не натоварва ключовите маркери засягащи реактивни кислородни радикали и подчертава положителния му ефект в патологичния модел.

1. Патологичният модел, комбиниращ мелатонинов дефицит чрез пинеалектомия с последваща след седмица ицв инфузия на  $A\beta_{1-42}$ , е надежден и високовалиден експериментален модел на спорадична форма на БА. Той възпроизвежда ключови патогенетични механизми на заболяването – амилоидогенеза, тау-патология, когнитивни дефицити и дисрегулация на мелатониновата сигнализация, което го прави подходящ инструмент за изследване на нови терапевтични стратегии и валидиране на хибридни молекули с потенциални неvroпротективни ефекти.

2. Мелатонинът се утвърждава като подходящо и обосновано референтно вещество при предклинични изследвания върху модели на спорадична форма на БА. Той демонстрира комбинирани антиоксидантни, рецепторно- и вътреклетъчно-медиирани антиамилоидни ефекти, които го правят подходяща позитивна контрола при оценка на потенциални неvroпротективни средства. В рамките на използвания комбиниран модел на пинеалектомия и ицв инфузия на  $A\beta_{1-42}$  мелатонинът демонстрира защитни ефекти върху когнитивните функции чрез стимулиране на неамилоидогенния сигнален път опосредстван от MT1 рецепторите и вътреклетъчната сигнализация чрез SIRT1.

3. Съединението **3c** показва способност да възстановява неамилоидогенния мелатонинов сигнален път чрез нормализация експресията на двата мелатонинови рецептора, MT1 и MT2 в хипокамп и активация на низходящата ERK1/2–CREB сигнална каскада, което подпомага когнитивното възстановяване в условия на  $A\beta$ -индуцирана патология и мелатонинов дефицит.

## ИЗВОДИ

4. Съединението **3a** демонстрира силно въздействие върху оксидативния статус, като нормализира нивата на антиоксидантни ензими и редуцира липидната пероксидация, което допринася за неговия невропротективен потенциал.

5. Синтезът на хидразид-хидразоновите производни се откроява като перспективен метод за реализиране на нови фармакофорни кандидати с мултитаргетно действие. Техният профил предлага реална възможност за разработване на нови терапевтични стратегии при БА и други невродегенеративни патологии.

## 1. Оригинални приноси

### 1.1. Първо експериментално изследване с фокус върху неамилоидогенния мелатонинов сигнален път.

За първи път е акцентирано върху активацията на неамилоидогенната мелатонинова сигнализация, вътреклетъчната, асоциирана със SIRT1 и рецепторната, която активира верига от ензимни реакции.

### 6.1. *In vivo* анализ на хидразид-хидразонов хибриди при плъхове.

За първи път в България бяха проведени *in vivo* тестове върху плъши модел на новосинтезирани хидразид-хидразони с мултифакторно действие. Чрез прилагането на стандартни и утвърдени поведенчески методики се установи техният потенциал да коригират ключови когнитивни и молекулярни нарушения, което доказва приложимостта им като надеждни фармакологични препарати за бъдещо терапевтично развитие.

## 2. Потвърждаващи приноси

### 2.1. Иновативен хибриден модел на БА при плъхове

Използваният модел, който комбинира пинеалектомия и интрацеребровентрикуларна инфузия на  $A\beta_{1-42}$ , представлява оригинален хибриден подход. Той ефективно възпроизвежда ключови патогенетични аспекти на БА — амилоидна и тау-патология, мелатонинов дефицит и когнитивни нарушения, осигурявайки висока валидност и надеждност за изследване на терапевтични стратегии.

## 2.2. Ролята на мелатонина като протективен агент при БА

Резултатите подкрепят вече известните данни, че мелатонинът упражнява неврорепротективни ефекти чрез рецепторно-медиирани и антиоксидантни механизми, коригирайки когнитивни дефицити и стабилизирайки сигнални каскади, свързани с паметта.

## 2.3. Връзката между мелатонинов дефицит и ускорена невродегенерация

Данните от моделната група (пинеалектомия +  $A\beta_{1-42}$ ) показват изразени когнитивни нарушения и молекулярни промени, което потвърждава съществуващите хипотези, че намалените нива на мелатонин при стареене допринасят за патогенезата на БА.

## 2.4. Приложимост на валидирани поведенчески тестове, отговорни за краткосрочна памет и хипокамп-асоциирани дисфункции.

Използваните протоколи (Y-maze, ORT, OLT) показват чувствителност към индуцираните дефицити и ефектите на терапевтични интервенции, потвърждавайки тяхната надеждност за оценка на паметови функции при гризачи.

## ПРОЕКТИ:

1. Договор № КП-06 ПН63/2 с ФНИ, по проект на тема: Неврофармакологични проучвания на новосинтезирани сулфанил хидразони и мелатонинови производни с холинестеразна инхибиторна активност при модели на болест на Алцхаймер и мелатонинов дефицит
2. Договор КП-06-Н61/12, по проект на тема: Проучване ролята на неврогенезата в модулаторното повлияване на консолидацията в хипокампа от норадренергичната медиация в норма и патология: нови терапевтични подходи
3. Договор РМС №455/27.06.2024 с МОН, по проект на тема: НП Образование с наука - "Биохимични методи в невробиологията"
4. Младежки проект от 2022г с ръководител гл. ас. Цвета Стоянова. на тема: Полово-зависими проучвания при модели с пренатални въздействия: терапевтични ефекти
5. Договор № ЗИУ-мп-15/ 09.08.2024 г. по международен проект Оценка и неврофармакологични проучвания на синтетични производни на N-бензил пирролидин като инхибитори на моноаминооксидазата към МУ-София.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С НАСТОЯЩИЯ ТРУД:

Ivanova P, Kortenska L, Angelova VT, Tchekalarova J. The Novel Melatonin Analog Containing Donepezil Fragment Prevents Cognitive Impairments and Associated Oxidative Stress in a Hybrid Rat Model of Melatonin Deficiency and icvA $\beta$ <sub>1-42</sub>. Int J Mol Sci. 2025 Jul 8;26(14):6553. doi: 10.3390/ijms26146553. PMID: 40724803; PMCID: PMC12294633.

Mihaylova R, Angelova VT, Tchekalarova J, Atanasova D, Ivanova P, Simeonova R. Tailored Melatonin- and Donepezil-Based Hybrids Targeting Pathognomonic Changes in Alzheimer's Disease: An In Vitro and In Vivo Investigation. Int J Mol Sci. 2024 May 29;25(11):5969. doi: 10.3390/ijms25115969. PMID: 38892154; PMCID: PMC11172853.

Tchekalarova J, Ivanova P, Krushovlieva D, Kortenska L, Angelova VT. Protective Effect of the Novel Melatonin Analogue Containing Donepezil Fragment on Memory Impairment via MT/ERK/CREB Signaling in the Hippocampus in a Rat Model of Pinealectomy and Subsequent A $\beta$ <sub>1-42</sub> Infusion. Int J Mol Sci. 2024 Feb 3;25(3):1867. doi: 10.3390/ijms25031867. PMID: 38339146; PMCID: PMC10855364.

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ (без автоцитати):

Ayobami, F. G., Ogundipe, O. J., Emmanuel, A. A., & Kolawole, I. O. (2025). Effects of lauric acid on cognitive impairment in a scopolamine-induced Alzheimer's disease-like rat model. *Nutritional Neuroscience*.

<https://doi.org/10.1080/1028415X.2025.2508775>

Cimen, Y. A., Elibol, B., Korkmaz, N. D., Yuzgulec, M., Kinsiz, B., Kutlu, S., & Ustunova, S. (2025). The Impact of Ketogenic Diet Consumption on the Sporadic Alzheimer's Model Through MT1/MT2 Regulation. *Journal of Neuroscience Research*, 103(8). <https://doi.org/10.1002/jnr.70070>

Galvani, F., Cammarota, M., Vacondio, F., Rivara, S., & Boscia, F. (2024a). Protective Activity of Melatonin Combinations and Melatonin-Based Hybrid Molecules in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Pineal Research*, 76(8). <https://doi.org/10.1111/jpi.70008>

Galvani, F., Cammarota, M., Vacondio, F., Rivara, S., & Boscia, F. (2024b). Protective Activity of Melatonin Combinations and Melatonin-Based Hybrid Molecules in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Pineal Research*, 76(8). <https://doi.org/10.1111/jpi.70008>

Liu, J., Li, Y., Kulsoom, & Wang, F. (2025). Shedding light on Alzheimer's disease: Recent advances in highly selective fluorescent probes. *Coordination Chemistry Reviews*, 522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2024.216221>

Ma, L., Wei, Q., Jiang, M., Wu, Y., Liu, X., Yang, Q., Bai, Z., & Yang, L. (2025). Hippocampal Neurogenesis in Alzheimer's Disease: Multimodal Therapeutics and the Neurogenic Impairment Index Framework. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/ijms26136105>

Wu, L., Sun, Y., Yin, Y., Wu, Z., Liu, R., Liu, Y., Zhu, Y., Shao, M., Zhou, H., Lu, C., & Zhang, H. (2025). Lanco decoction in the treatment of alzheimer's disease via activating PI3K/AKT signaling to promote ERK involving in enhancing neuronal activities in the hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology*, 338.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.119017>

Zueva, I., Belyaev, G., & Petrov, K. (2025). Disease-modifying effect of donepezil on APP/PS1 mice at different stages of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*. [https://doi.org/10.1007/s11010-025-05310-](https://doi.org/10.1007/s11010-025-05310-2)

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ИЗНЕСЕНИ ДОКЛАДИ:

- НАЦИОНАЛНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ - 2023г., 14-15 декември, ИНБ, София  
с доклад: *In vivo* studies of new indole hydrazide–hydrazone hybrid as multitarget agent in a rat model of pinealectomy and subsequent icv A $\beta$ 1-42 infusion.
- 4th Interdisciplinary PhD forum with international participation, 16-19 May 2023, Sandanski, Bulgaria; scientific report: The role of melatonin in the pathogenesis of Alzheimer’s disease.
- 8th National Conference with International Participation “Morphological Days” June 10-12, 2022 Sofia; scientific report: Impact of melatonin deficit on physiological function in young adult, mature and old rats: role of oxidative stress

- ❖ *ИСКАМ ДА ИЗКАЖА ИСКРЕНИТЕ СИ БЛАГОДАРНОСТИ КЪМ ВСИЧКИ КОЛЕГИ ВЗЕЛИ УЧАСТИЕ КАКТО В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА, ТЕХНИЧЕСКАТА, И АДМИНИСТРАТИВНА ЧАСТ СВЪРЗАНА С НАСТОЯЩИЯ ТРУД. ЗА МЕН БЕШЕ ЧЕСТ ДА РАБОТЯ В ТОЛКОВА ДИНАМИЧНА, МОТИВИРАЩА И ПРОФЕСИОНАЛНА СРЕДА. БЕЗУПРЕЧНИТЕ РЕЗУЛТАТИ, КОИТО ПОЛУЧИХМЕ ПОКАЗВАТ ДОСТАТЪЧНО КРАСНОРЕЧИВО УСЪРДНАТА РАБОТА И СЕ НАДЯВАМ ОТНОВО ДА ИМАМ ВЪЗМОЖНОСТТА ДА РАБОТЯ С ВАС. БЛАГОДАРЯ ВИ ЗА ОТДАДЕННОСТТА И ПРОФЕСИОНАЛИЗМА, ВАШИТЕ УСИЛИЯ СА ОЦЕНЕНИ!*
  
- ❖ *БЛАГОДАРЯ НА МОИТЕ РЪКОВОДИТЕЛИ: ПРОФ. ЯНА ЧЕКАЛАРОВА И ПРОФ. ВИОЛИНА СТОЯНОВА ЗА СЪДЕЙСТВИЕТО И ТОВА, ЧЕ МЕ ВОДЕХА ПРЕЗ ТОЗИ НЕ ЛЕСЕН ПЕРИОД НА АКАДЕМИЧНАТА МИ КАРИЕРА. ОГРОМНИ БЛАГОДАРНОСТИ ЗА ПРОФ. ЧЕКАЛАРОВА, КОЯТО МЕ ВЪВЕДЕ В НЕВРОНАУКАТА И МЕ НАПЪТСТВАШЕ ПРЕЗ ВСЕКИ ЕДИН МОМЕНТ, НЕ САМО В ИЗГРАЖДАНЕТО НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, НО И ВЪВ ВСИЧКИ ОСТАНАЛИ АСПЕКТИ. С НЕЙНОТО БЕЗАПЕЛАЦИОННО СЪДЕЙСТВИЕ УСПЯХ ДА НАУЧА И РЕАЛИЗИРАМ НОВИ НАУЧНИ МЕТОДИКИ, КОИТО СЕ НАДЯВАМ ДА ПОДЧЕРТАЯТ АВТОРИТЕТА НА НАПРАВЛЕНИЕ „ПОВЕДЕНЧЕСКА НЕВРОБИОЛОГИЯ“.*
  
- ❖ *НЕ НА ПОСЛЕДНО МЯСТО, БЛАГОДАРЯ НА ВТОРИЯ МИ РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. ВИОЛИНА СТОЯНОВА И ЕКИПА ѝ ОТ ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ КЪМ МУ, ЧИЙТО ТРУД БЕШЕ ОСНОВАТА НА НАШИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ. БЛАГОДАРЯ ВИ ЗА ОКАЗАНОТО СЪДЕЙСТВИЕ И ВЪЗМОЖНОСТТА ДА БЪДА ЧАСТ ОТ СЪЗДАВАНЕТО НА ЕДИН ПЕРСПЕКТИВЕН ФАРМАКОЛОГИЧЕН ПОДХОД!*

**NEUROPHARMACOLOGICAL STUDIES OF NEWLY SYNTHESIZED  
SULFANILHYDRAZONES AND MELATONIN DERIVATIVES WITH  
CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY IN MODELS OF  
ALZHEIMER'S DISEASE AND MELATONIN DEFICIENCY**

*/PhD Thesis/*

PETYA PETKOVA IVANOVA

Institute of neurobiology, Bulgarian Academy of Science

**SUMMARY:**

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that primarily affects the elderly population and is characterized by a gradual decline in memory functions, cognitive capacity, and adaptive behavior. As the most common form of dementia, AD represents a significant medical and social challenge against the backdrop of global population aging. Epidemiological data indicate a persistent trend of increasing incidence, making the disease not only an individual health problem but also a serious demographic and economic burden on healthcare systems. This necessitates the search for innovative therapeutic approaches capable not only of alleviating symptoms but also of slowing down or modifying the pathophysiological mechanisms of the disease.

Current therapies, including acetylcholinesterase (AChE) inhibitors such as Donepezil, provide partial improvement of cholinergic neurotransmission and temporary stabilization of cognitive functions. However, their effectiveness remains limited, and the disease continues to progress. On the other hand, melatonin, a hormone regulating circadian rhythms, exhibits pronounced antioxidant and neuroprotective properties, particularly under conditions of oxidative stress and melatonin deficiency—factors associated with the development of AD.

Given the need for multimodal therapeutic strategies, the last decade has seen growing interest in the development of hybrid molecules capable of combining different mechanisms of action within a single structure. Newly synthesized hydrazide–hydrazone compounds, which integrate cholinesterase inhibition with antioxidant properties, represent a promising class of molecules with potential synergistic effects. Hybrids combining structural elements of Donepezil and melatonin offer a promising strategy for comprehensive neuroprotection by simultaneously targeting the cholinergic system and reducing oxidative stress.

The present dissertation focuses on a neuropharmacological investigation aimed at evaluating the efficacy of two newly synthesized hybrid compounds (provisionally designated as 3a and 3c), containing hydrazide–hydrazone pharmacophores, on behavioral and biochemical markers in a rat model of AD induced under conditions of melatonin deficiency. The chosen experimental model was validated through the reproduction of key pathophysiological features observed in the human form of the disease, including pronounced cognitive impairment, activation of the amyloidogenic signaling pathway, and oxidative stress with disturbances in redox homeostasis.

Behavioral testing demonstrated that administration of compounds 3a and 3c led to statistically significant improvements in cognitive function compared to the control model group exposed

to melatonin deficiency, as well as favorable biochemical dynamics, supporting the hypothesis of an effective combined mechanism of action of the tested molecules.

In summary, the results of this dissertation support the hypothesis of a synergistic mechanism of action of the hybrid molecules—simultaneous cholinesterase inhibition, antioxidant defense, and modulation of  $\beta$ -amyloid toxicity. This lays the foundation for the development of a new class of multifunctional therapeutic agents for AD treatment, based on hydrazide–hydrazone structures.

1. Angelova, V.T.; Stoyanov, B.P.; Simeonova, R. New Insights into the Development of Donepezil-Based Hybrid and Natural Molecules as Multi-Target Drug Agents for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules* 2024, 29, doi:10.3390/MOLECULES29225314.
2. Angelova, V.T.; Georgiev, B.; Pencheva, T.; Pajeva, I.; Rangelov, M.; Todorova, N.; Zheleva-Dimitrova, D.; Kalcheva-Yovkova, E.; Valkova, I. V.; Vassilev, N.; et al. Design, Synthesis, In Silico Studies and In Vitro Evaluation of New Indole- and/or Donepezil-like Hybrids as Multitarget-Directed Agents for Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 1194, doi:10.3390/PH16091194/S1.
3. Hoffman, R.A.; Reiter, R.J. Rapid Pinealectomy in Hamsters and Other Small Rodents. *Anat Rec* 1965, 153, 19–21, doi:10.1002/AR.1091530103.
4. Tzoneva, R.; Georgieva, I.; Ivanova, N.; Uzunova, V.; Nenchevska, Z.; Apostolova, S.; Stoyanova, T.; Tchekalarova, J. The Role of Melatonin on Behavioral Changes and Concomitant Oxidative Stress in IcvAβ1-42 Rat Model with Pinealectomy. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 12763, doi:10.3390/IJMS222312763.
5. Tchekalarova, J.; Nenchevska, Z.; Kortenska, L.; Uzunova, V.; Georgieva, I.; Tzoneva, R. Impact of Melatonin Deficit on Emotional Status and Oxidative Stress-Induced Changes in Sphingomyelin and Cholesterol Level in Young Adult, Mature, and Aged Rats. *Int J Mol Sci* 2022, 23, doi:10.3390/IJMS23052809/S1.
6. Rat Brain Atlas Available online: <https://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/> (accessed on 28 July 2025).
7. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates | ScienceDirect Available online: <https://www.sciencedirect.com/book/9780125476201/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates> (accessed on 28 July 2025).
8. Sanei, M.; Saberi-Demneh, A. Effect of Curcumin on Memory Impairment: A Systematic Review. *Phytomedicine* 2019, 52, 98–106, doi:10.1016/j.phymed.2018.06.016.
9. Kim, D.H.; Jang, Y.S.; Jeon, W.K.; Han, J.S. Assessment of Cognitive Phenotyping in Inbred, Genetically Modified Mice, and Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Exp Neurobiol* 2019, 28, 146–157, doi:10.5607/EN.2019.28.2.146.
10. Vogel-Ciernia, A.; Wood, M.A. Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. *Curr Protoc Neurosci* 2014, 69, 8.31.1-8.31.17, doi:10.1002/0471142301.NS0831S69.
11. Sanei, M.; Saberi-Demneh, A. Effect of Curcumin on Memory Impairment: A Systematic Review. *Phytomedicine* 2019, 52, 98–106, doi:10.1016/j.phymed.2018.06.016.
12. Ghafarimoghdam, M.; Mashayekh, R.; Gholami, M.; Fereydani, P.; Shelley-Tremblay, J.; Kandezi, N.; Sabouri, E.; Motaghinejad, M. A Review of Behavioral Methods for the Evaluation of Cognitive Performance in Animal Models: Current Techniques and Links to Human Cognition. *Physiol Behav* 2022, 244, doi:10.1016/j.physbeh.2021.113652.
13. Tchekalarova, J.; Krushovlieva, D.; Ivanova, P.; Kortenska, L. Spontaneously Hypertensive Rats vs. Wistar Kyoto and Wistar Rats: An Assessment of Anxiety, Motor Activity, Memory Performance, and Seizure Susceptibility. *Physiol Behav* 2023, 269, 114268, doi:10.1016/J.PHYSBEH.2023.114268.

14. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
15. Galvani, F.; Cammarota, M.; Vacondio, F.; Rivara, S.; Boscia, F. Protective Activity of Melatonin Combinations and Melatonin-Based Hybrid Molecules in Neurodegenerative Diseases. *J Pineal Res* 2024, 76, doi:10.1111/jpi.70008.
16. Cecon, E.; Chen, M.; Marçola, M.; Fernandes, P.A.C.; Jockers, R.; Markus, R.P. Amyloid  $\beta$  Peptide Directly Impairs Pineal Gland Melatonin Synthesis and Melatonin Receptor Signaling through the ERK Pathway. *FASEB J* 2015, 29, 2566–2582, doi:10.1096/FJ.14-265678.
17. Cardinali, D.P.; Vigo, D.E.; Olivar, N.; Vidal, M.F.; Brusco, L.I. Melatonin Therapy in Patients with Alzheimer's Disease. *Antioxidants* 2014, Vol. 3, Pages 245-277 2014, 3, 245–277, doi:10.3390/ANTIOX3020245.
18. Shukla, M.; Govitrapong, P.; Boontem, P.; Reiter, R.J.; Satayavivad, J. Mechanisms of Melatonin in Alleviating Alzheimer's Disease. *Curr Neuroparmacol* 2017, 15, 1010, doi:10.2174/1570159X15666170313123454.
19. Tchekalarova, J.; Nenchovska, Z.; Atanasova, D.; Atanasova, M.; Kortenska, L.; Stefanova, M.; Alova, L.; Lazarov, N. Consequences of Long-Term Treatment with Agomelatine on Depressive-like Behavior and Neurobiological Abnormalities in Pinealectomized Rats. *Behavioural brain research* 2016, 302, 11–28, doi:10.1016/J.BBR.2015.12.043.
20. Tchekalarova, J.; Atanasova, M.; Ivanova, N.; Boyadjiev, N.; Mitreva, R.; Georgieva, K. Endurance Training Exerts Time-Dependent Modulation on Depressive Responses and Circadian Rhythms of Corticosterone and BDNF in the Rats with Pinealectomy. *Brain Res Bull* 2020, 162, 40–48, doi:10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.05.012.
21. Tchekalarova, J.D.; Georgieva, I.; Tzoneva, R.; Angelova, V.T. Aggregated Amyloid-beta1-42 Infusion Following Pinealectomy Induces Alzheimer's Diseases in Rats in a Week: Behavioral and Biochemical Impairments. *Alzheimer's & Dementia* 2023, 19, doi:10.1002/ALZ.082270.
22. Elder, G.A.; Gama Sosa, M.A.; De Gasperi, R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med* 2010, 77, 69, doi:10.1002/MSJ.20159.
23. Poon, C.H.; Wang, Y.; Fung, M.L.; Zhang, C.; Lim, L.W. Rodent Models of Amyloid-Beta Feature of Alzheimer's Disease: Development and Potential Treatment Implications. *Aging Dis* 2020, 11, 1235, doi:10.14336/AD.2019.1026.
24. Kasza, Á.; Penke, B.; Frank, Z.; Bozsó, Z.; Szegedi, V.; Hunya, Á.; Németh, K.; Kozma, G.; Fülöp, L. Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized  $\beta$ -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 2007 2017, 22, 2007, doi:10.3390/MOLECULES22112007.
25. Hughes, R.N. The Value of Spontaneous Alternation Behavior (SAB) as a Test of Retention in Pharmacological Investigations of Memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2004, 28, 497–505, doi:10.1016/J.NEUBIOREV.2004.06.006.
26. D'Hooge, R.; De Deyn, P.P. Applications of the Morris Water Maze in the Study of Learning and Memory. *Brain Res Rev* 2001, 36, 60–90, doi:10.1016/S0165-0173(01)00067-4.
27. Ennaceur, A.; Delacour, J. A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data. *Behavioural Brain Research* 1988, 31, 47–59, doi:10.1016/0166-4328(88)90157-X.

28. Gáll, Z.; Boros, B.; Kelemen, K.; Urkon, M.; Zolcseak, I.; Márton, K.; Kolcsar, M. Melatonin Improves Cognitive Dysfunction and Decreases Gliosis in the Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* 2024, 15, 1447757, doi:10.3389/FPHAR.2024.1447757/BIBTEX.
29. Barker, G.R.I.; Warburton, E.C. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *Journal of Neuroscience* 2011, 31, 10721–10731, doi:10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011,.
30. Wirths, O.; Bayer, T.A. Neuron Loss in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010, 2010, 723782, doi:10.4061/2010/723782.
31. Shukla, M.; Govitrapong, P.; Boontem, P.; Reiter, R.J.; Satayavivad, J. Mechanisms of Melatonin in Alleviating Alzheimer's Disease. *Curr Neuroparmacol* 2017, 15, doi:10.2174/1570159X15666170313123454.
32. Braak, H.; Braak, E. Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathol* 1991, 82, 239–259, doi:10.1007/BF00308809,.
33. Antunes, M.; Biala, G. The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications. *Cogn Process* 2012, 13, 93–110, doi:10.1007/S10339-011-0430-Z,.
34. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Galano, A. Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology* 2014, 29, 325–333, doi:10.1152/PHYSIOL.00011.2014,.
35. Hiraoka, K.; Okamura, N.; Funaki, Y.; Watanuki, S.; Tashiro, M.; Kato, M.; Hayashi, A.; Hosokai, Y.; Yamasaki, H.; Fujii, T.; et al. Quantitative Analysis of Donepezil Binding to Acetylcholinesterase Using Positron Emission Tomography and [5-11C-Methoxy]Donepezil. *Neuroimage* 2009, 46, 616–623, doi:10.1016/J.NEUROIMAGE.2009.03.006.
36. Shin, C.Y.; Kim, H.S.; Cha, K.H.; Won, D.H.; Lee, J.Y.; Jang, S.W.; Sohn, U.D. The Effects of Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, on Impaired Learning and Memory in Rodents. *Biomol Ther (Seoul)* 2018, 26, 274, doi:10.4062/BIOMOLTHER.2017.189.
37. Savaskan, E.; Ayoub, M.A.; Ravid, R.; Angeloni, D.; Fraschini, F.; Meier, F.; Eckert, A.; Müller-Spahn, F.; Jockers, R. Reduced Hippocampal MT2 Melatonin Receptor Expression in Alzheimer's Disease. *J Pineal Res* 2005, 38, 10–16, doi:10.1111/J.1600-079X.2004.00169.X,.
38. Liu, J.; Clough, S.J.; Hutchinson, A.J.; Adamah-Biassi, E.B.; Popovska-Gorevski, M.; Dubocovich, M.L. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016, 56, 361–383, doi:10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124742,.
39. Dubocovich, M.L.; Markowska, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* 2005, 27, 101–110, doi:10.1385/ENDO:27:2:101,.
40. Chen, M.; Cecon, E.; Karamitri, A.; Gao, W.; Gerbier, R.; Ahmad, R.; Jockers, R. Melatonin MT1 and MT2 Receptor ERK Signaling Is Differentially Dependent on Gi/o and Gq/11 Proteins. *J Pineal Res* 2020, 68, doi:10.1111/JPI.12641.
41. Wang, L.M.; Suthana, N.A.; Chaudhury, D.; Weaver, D.R.; Colwell, C.S. Melatonin Inhibits Hippocampal Long-Term Potentiation. *European Journal of Neuroscience* 2005, 22, 2231–2237, doi:10.1111/J.1460-9568.2005.04408.X,.

42. Herskovits, A.Z.; Guarente, L. SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron* 2014, *81*, 471–483, doi:10.1016/j.neuron.2014.01.028.
43. Mukda, S.; Panmanee, J.; Boontem, P.; Govitrapong, P. Melatonin Administration Reverses the Alteration of Amyloid Precursor Protein-Cleaving Secretases Expression in Aged Mouse Hippocampus. *Neurosci Lett* 2016, *621*, 39–46, doi:10.1016/j.neulet.2016.04.013.
44. Dudchenko, P.A. An Overview of the Tasks Used to Test Working Memory in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2004, *28*, 699–709, doi:10.1016/j.neubiorev.2004.09.002.
45. Lalonde, R. The Neurobiological Basis of Spontaneous Alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, *26*, 91–104, doi:10.1016/S0149-7634(01)00041-0.
46. Bendheim, P.E.; Poeggeler, B.; Neria, E.; Ziv, V.; Pappolla, M.A.; Chain, D.G. Development of Indole-3-Propionic Acid (OXIGON) for Alzheimer's Disease. *J Mol Neurosci* 2002, *19*, 213–217, doi:10.1007/S12031-002-0036-0.
47. Labban, S.; Alshehri, F.S.; Kurdi, M.; Alatawi, Y.; Alghamdi, B.S. Melatonin Improves Short-Term Spatial Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 2021, *11*, 15, doi:10.2147/DNND.S291172.
48. Keymoradzadeh, A.; Komaki, A.R.; Bakhshi, A.; Faraji, N.; Golipoor, Z.; Shahshahani, P. The Effect of Different Doses of Melatonin on Learning and Memory Deficit in Alzheimer Model of Rats. *Casp J Neurol Sci* 2021, *7*, 1–9, doi:10.32598/CJNS.7.24.1.
49. Forman, H.J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009, *30*, 1–12, doi:10.1016/J.MAM.2008.08.006,.
50. Butterfield, D.A.; Halliwell, B. Oxidative Stress, Dysfunctional Glucose Metabolism and Alzheimer Disease. *Nat Rev Neurosci* 2019, *20*, 148–160, doi:10.1038/S41583-019-0132-6,.