

Рецензия

на дисертационния труд на задочен докторант **инж. Петя Петкова Иванова**, за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“ по професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма „Фармакология“, Институт по невробиология, Българска Академия на науките.

Рецензент: **доц. Даниела Пехливанова, д.м.**, Институт по невробиология, Българска Академия на науките (член на научното жури със заповед 50/26.09.2025 г. на Директора на ИНБ, БАН)

Тема на дисертационния труд: **„НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ СУЛФАНИЛ ХИДРАЗНИ И МЕЛАТОНИНОВИ ПРОИЗВОДНИ С ХОЛИНЕСТЕРАЗНА ИНХИБИТОРНА АКТИВНОСТ ПРИ МОДЕЛИ НА БОЛЕСТ НА АЛЦХАЙМЕР И МЕЛАТОНИНОВ ДЕФИЦИТ“.**

1. Структура на дисертационния труд.

Дисертационният труд е разработен съгласно класическата структура върху 100 страници, включващи 2 стр. Увод, 21 стр. Литературен обзор, 1 стр. Цел и задачи, 19 стр. Материали и методи, 22 стр. Резултати, 14 стр. Дискусия, 2 стр. Изводи, 2 стр. Приноси, 14 стр. Библиография и 3 стр. Приложения.

Уводът предоставя основна информация върху важността на изследваното заболяване и перспективността на новосинтезираните молекули като потенциални терапевтици.

2. Актуалност на темата и съответствие с поставените цели.

Темата обединява два проблема свързани със стареенето и намира сечението между тях при търсенето на нови подходи за комбинирана терапия на Болестта на Алцхаймер и разстройството в мелатониновата активност характерни за хора в напреднала възраст. Синтезът на нови хибридни молекули, които включват повече от една фармакофорна група е модерен подход при търсене на потенциални лекарства, които атакуват различни патологични процеси конвергиращи към развитието на комплексно заболяване като БА. Изследваните молекули са част от 30 новосинтезирани на основата на донепезила и мелатонина, което позволява използването на два фармакологични инструмента при опита за възстановяване на физиологичната функция на ацетилхолиновата невротрансмисия и мелатониновата хормонална регулация.

3. Анализ на литературата по изследвания проблем.

Литературният обзор започва с класификация и статистически данни за разпространението на болестта на Алцхаймер (БА). Описани са основните хипотези за патогенезата на БА с акцент върху дисфункцията на амилоидните протеинови продукти, хиперфосфорилирането на тау протеина и свързаните с тези процеси нарушения в оксидативния баланс и свръхактивиране на микроглията, които провокират процесите на апоптоза и некроза на мозъчните структури. Отделено е внимание на метаболитните и

циркулаторни дисфункции като рискови фактори за БА, заедно с резултиращото нарушение на оксидативния статус. Цитирани са данни за нарушена секреция и фазово отместване на пиковите на мелатонина при развитие на БА. Някои от патологичните механизми са обединени последователно в една обща хипотеза. Описани са известните досега клетъчни механизми чрез които мелатонина въздейства върху амилоидната и тау-патология, невровъзпалението и ацетилхолинергичния дефицит при различни модели на БА.

Включен е критичен преглед на използваните до момента фармакологични подходи при лечението на БА, които включват инхибитори на ацетилхолинестеразата, антагонисти на NMDA рецепторите, имунотерапия, експериментални терапии с включване на антиоксиданти, инхибитори на тау агрегацията и противовъзпалителни средства.

Отделен параграф е посветен на състоянието на изследвания проблем до момента. От приложените данни личи, че изследваните молекули са предварително синтезирани и детайлно анализирани от членове на работния екип, които имат пионерни постижения в тази област. Дисертационният труд се явява логично продължение на този анализ, който е проведен върху иновативен хибриден модел на мелатонинов дефицит предизвикан чрез епифизиотомия и интрацеребрална инфузия на невротоксичния пептид амилоид бета 1-42.

4. Формулиране на цел и задачи

Целта е конкретна и отразява предходния опит при изследването на конкретните молекули. Формулираните задачи дават ясна представа как е предвидено постигането на поставената цел.

5. Използвани методи и подходи

Описаните методи и експериментален дизайн дават реална възможност за повторение на изследването. Използвани са два паралелни експериментални модела - на деменция от Алцхаймеров тип и на мелатонинов дефицит, които поотделно са широко валидирани. Тук е приложен иновативен подход за едновременното им индуциране, който се приближава до естествените процеси на спорадичния тип БА.

Експерименталният дизайн е визуализиран на фигура 5.

Изследването на когнитивното поведение и паметта е направено чрез прилагането на три различни метода, които отразяват участието на различни структурни и функционални невронни мрежи при изследването на непозната среда и запаметяване на детайли в нея. Хипокампът е избраната мозъчна структура за биохимичните тестове, защото има данни за ранни увреждания точно в тези структура преди клиничната проява на БА. Описаните биохимични методи са с много висока чувствителност. Протоколите за тяхното изпълнение са дадени в детайли. Статистическите методи съответстват на вида на изследваните данни.

6. Описание и графично представяне на резултатите от изследването.

Резултатите са описани изчерпателно, като са разделени на две кохорти третирани съответно с по една от целевите молекули. Всички тестове са направени паралелно с

мелатонин като референтна молекула. Данните са визуализирани на 13 фигури, които включват резултатите от поведенческите и биохимични тестове.

7. Обсъждане

Обсъждането започва с подробен анализ на преимуществата на комбинирания модел на невродегенеративното заболяване. Получените резултати от изследването на двете съединения са дискутирани поотделно в два раздела, в които е отделено внимание на всеки от проучените параметри. Критично са дискутирани данните от изследването на ацетилхолин естеразата, като е отбелязано че вероятно ефектите на проучваното съединение са свързани по-скоро с инхибиране на ензимната активност, а не с количествени промени на ензима.

Коректно са дискутирани силните и слаби страни на дисертационния труд, като е очертан потенциал за бъдещи изследвания по темата.

8. Изводи

Изводите включват най-съществените открития и са групирани съответно с проучвания механизъм.

9. Приноси

Приносите показват ясно най-съществените оригинални открития, а потвърдителните доказват подходящия подбор на методи и правилното формулиране на целта.

10. Библиография

Използваната литература включваща 107 източника е богата на заглавия от последните пет години и се основава на водещи изследвания в областта на дисертационния труд. Библиографията е достатъчна по обем и е цитирана ясно.

11. Оценка на разпространение на резултатите - публикации и участия в научни форуми.

Резултатите от дисертационния труд са докладвани на 3 научни форума в България и са публикувани в 3 статии в Int J Mol Sci., с висок импакт фактор и квантил Q1. Тези публикации покриват напълно минималните национални изисквания и тези заложи в правилника на ИНБ, БАН. Забелязани са 8 цитирания на публикациите по дисертационния труд.

12. Критични забележки и препоръки

Дисертационен труд и публикациите към него са написани на много добър научен език, с ясна структура, задълбоченост. Отправените по време на предзащитата препоръки целяха изглаждане на представянето и стилистични детайли по дисертационния труд и не променят цялостното отлично впечатление от проведените изследвания и тяхното представяне. Докторантката се е съобразила с тях и е направила корекции преди защитата.

С оглед на високото ниво на реализираната научна работа и постигнати резултати, нямам критични забележки относно дисертационния труд.

13. Автореферат

Авторефератът (общ обем 62 страници) е направен според изискванията и отразява в достатъчна степен основните постижения на дисертационния труд.

14. **Заключение:** Въз основа на горепосоченото считам, че дисертационния труд на инж. Петя Иванова има значителен принос в развитието на невробиологията и фармакологията на Болестта на Алцхаймер и съпровождащите нарушения в секрецията на мелатонина. Оригиналните данни са публикувани в специализирано научно списание с осигурена достъпност на пълнотекстови статии и висок индекс на цитиране. Докторантката е показала отлично владение на методите и лекота при дискутиране на резултатите, което я приобщава към числото на изградените учени. Образователните и наукометричните показатели са изпълнени изцяло и надхвърлят количествените и качествени минимални национални критерии и тези за придобиване на ОНС „доктор“ в ИНБ-БАН. Получените резултати, формулираните изводи и безспорните приноси на дисертацията **ми дават основание убедено да препоръчам на почитаемото жури да присъди образователната и научна степен „доктор“, в област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“, професионално направление 7.1. Медицина, Научна специалност „Фармакология“ на инж. Петя Петкова Иванова.**

Дата: 17.10.2025 г.

Подпис:

София

Review

of the thesis of part-time PhD student **Eng. Petya Petkova Ivanova**, for the award of the scientific and educational degree "Doctor" in professional field 7.1. Medicine, doctoral program "Pharmacology", Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences.

Reviewer: **Assoc. Prof. Daniela Pehlivanova, MD**, Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences (member of the scientific jury with order 50/26.09.2025 of the Director of the Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences)

Topic of the thesis: **"NEUROPHARMACOLOGY STUDIES OF NEWLY SYNTHESIZED SULFANYL HYDRAZONES AND MELATONIN DERIVATIVES WITH CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY IN MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND MELATONIN DEFICIENCY"**.

1. Structure of the thesis.

The thesis is developed according to the classical structure on 100 pages, including 2 pages Introduction, 21 pages Literature review, 1 page Aim and objectives, 19 pages Materials and methods, 22 pages Results, 14 pages Discussion, 2 pages Conclusions, 2 pages Contributions, 14 pages Bibliography and 3 pages Appendices. The introduction provides basic information on the importance of the studied disease and the prospects of the newly synthesized molecules as potential therapeutics.

2. Relevance of the topic and compliance with the set goals.

The topic unites two problems related to aging and finds the intersection between them in the search for new approaches for combined therapy of Alzheimer's disease and the disorder in melatonin secretion and regulation of elderly people. The synthesis of new hybrid molecules that include more than one pharmacophore group is a modern approach in the search for potential drugs that attack various pathological processes converging to the development of a complex disease such as AD. The studied molecules are part of 30 newly synthesized based on donepezil and melatonin, which allows the use of two pharmacological tools in the attempt to restore the physiological function of acetylcholine neurotransmission and melatonin hormonal regulation.

3. Analysis of the literature on the research problem.

The literature review begins with a classification and statistical data on the prevalence of Alzheimer's disease (AD). The main hypotheses for the pathogenesis of AD are described, with an emphasis on the dysfunction of amyloid protein products, hyperphosphorylation of tau protein and the associated disturbances in the oxidative balance and overactivation of microglia, which provoke the processes of apoptosis and necrosis of brain structures. Attention is paid to metabolic and circulatory dysfunctions as risk factors for AD, together with the resulting disturbance of the oxidative status. Data on impaired secretion and phase shift of melatonin peaks in the development of AD are cited. Some of the pathological mechanisms are consistently combined into one general hypothesis. The known cellular mechanisms by which melatonin affects amyloid and tau pathology, neuroinflammation and acetylcholine deficiency in various models of AD are described.

A critical review of the pharmacological approaches used to date in the treatment of AD is included, with references on acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, immunotherapy, experimental therapies involving antioxidants, tau aggregation inhibitors and anti-inflammatory agents.

A separate paragraph is devoted to the status of the research problem to date. The provided data show that the studied molecules were previously synthesized and analyzed in detail by members of the working team, who have pioneering achievements in this field. The dissertation is a logical continuation of this analysis, which was conducted on an innovative hybrid model of melatonin deficiency induced by epiphysiotomy and intracerebral infusion of the neurotoxic peptide amyloid beta 1-42.

4. Formulation of aim and tasks

The aim is specific and reflects previous experience in the study of specific molecules. The formulated tasks provide a clear idea of how the achievement of the set goal is envisaged.

5. Methods and approaches used

The described methods and experimental design provide a real opportunity for an objective repetition of the study. Two parallel experimental models were used - Alzheimer's type dementia and melatonin deficiency, which are separately widely validated. Here, an innovative approach for their simultaneous induction was applied, which approaches the natural processes of the sporadic type of AD.

The experimental design is visualized in Figure 5.

The study of cognitive behavior and memory was done by applying three different methods that reflect the participation of different structural and functional neural networks in the study of an unfamiliar environment and memorization of details in it. The hippocampus is the chosen brain structure for biochemical tests, because there is evidence of early damage in this structure before the clinical manifestation of AD. The described biochemical methods are very sensitive. The protocols for their implementation are given in detail. The statistical methods correspond to the type of data studied.

6. Description and graphical presentation of the results of the study.

The results are described comprehensively, divided into two cohorts treated with one of the target molecules respectively. All tests were performed in parallel with melatonin as a reference drug. The data are visualized in 13 figures, which include the results of the behavioral and biochemical tests.

7. Discussion

The discussion begins with a detailed analysis of the advantages of the combined model of neurodegenerative disease. The results obtained from the study of the two compounds are discussed separately in two sections, in which attention is paid to each of the parameters studied. The data from the study of acetylcholinesterase are critically discussed, noting that the effects of

the studied compound are probably related to inhibition of enzyme activity, rather than quantitative changes in the enzyme.

The strengths and weaknesses of the dissertation are properly discussed and the potential for future research on the topic is outlined.

8. Conclusions

The conclusions include the most significant findings and are grouped accordingly by research mechanism.

9. Contributions

The contributions clearly show the most significant original findings, and the confirmatory ones prove the appropriate selection of methods and the correct formulation of the goal.

10. References

The literature used, including 107 sources, is rich in titles from the last five years and is based on leading research in the field of the dissertation. The bibliography is sufficient in volume and is cited clearly.

11. Assessment of dissemination of the results - publications and participation in scientific forums.

The results of the dissertation have been reported at 3 scientific forums in Bulgaria and have been published in 3 articles in Int J Mol Sci., with a high impact factor and quartile Q1. These publications fully meet the minimum national requirements and those set out in the regulations of the Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences. 8 citations of the publications on the dissertation have been noted.

12. Critical remarks and recommendations

The dissertation and the publications to it are written in a very good scientific language, with a clear structure, and thoroughness. The recommendations made during the pre-defense procedure aimed at smoothing the presentation and stylistic details of the dissertation and do not change the overall excellent impression of the research conducted and their presentation. The PhD student has taken them into account and made corrections before the defense procedure. In view of the high level of the scientific work carried out and the results achieved, I have no critical remarks about the dissertation.

13. Abstract

The abstract (total volume 62 pages) is prepared according to the requirements and sufficiently reflects the main achievements of the dissertation.

14. Conclusion: Based on the above, I believe that the thesis of Eng. Petya Ivanova has made a significant contribution to the development of the neurobiology and pharmacology of Alzheimer's disease and the accompanying disorders in melatonin secretion. The original data have been published in a specialized scientific journal with ensured accessibility of full-text

articles and a high citation index. The PhD student has shown excellent mastery of the methods and ease in discussing the results, which includes her in the number of established scientists. The educational and scientometric indicators have been fully met and exceed the quantitative and qualitative minimum national criteria and those for acquiring the PhD at the Institute of Neurobiology-BAS. **The results obtained, the formulated conclusions and the clear contributions of the dissertation give me reason to confidently recommend to the esteemed jury to award the educational and scientific degree PhD, in the field of higher education 7. "Healthcare and Sports", professional direction 7.1. Medicine, Scientific specialty "Pharmacology" of Eng. Petya Petkova Ivanova.**

17.10.2025 г.

Signature:

Sofia