

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
на задочен докторант Петя Петкова Иванова
Институт по невробиология - Българска академия на науките,
направление "Поведенческа невробиология"

Тема на дисертацията: „НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ СУЛФАНИЛ
ХИДРАЗОНИ И МЕЛАТОНИНОВИ ПРОИЗВОДНИ С ХОЛИНЕСТЕРАЗНА ИНХИБИТОРНА АКТИВНОСТ ПРИ МОДЕЛИ
НА БОЛЕСТ НА АЛЦХАЙМЕР И МЕЛАТОНИНОВ ДЕФИЦИТ“

Професионално направление: 7.1 Медицина, специалност Фармакология

Научни ръководители:

Проф. д-р Яна Чекаларова - Българска академия на науките, Институт по невробиология

Проф. д-р Виолина Стоянова - Фармацевтичен факултет, Медицински университет - София

От проф. д-р Милка Милчева Милева, Институт по микробиология "Стефан Ангелов" - Българска академия на науките

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, правилника за неговото приложение и изискванията за рецензенти на БАН, както и Европейските стандарти за рецензиране на докторски трудове.

Не познавам лично докторантката, нямам общи публикации с нея и не съм в конфликт на интереси, съгласно закона.

АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА ПРОБЛЕМАТИКАТА

Темата на дисертационния труд е изключително актуална и притежава висока научна и социална значимост. Болестта на Алцхаймер остава глобален здравен и социален проблем, за съжаление, с ограничени терапевтични възможности. Дисертацията адресира модерната стратегия за разработване на мулти-таргетно насочени лиганди (Multi-Target-Directed Ligands, MTDLs), които могат едновременно да въздействат върху няколко патогенетични пътя на болестта на

Алцхаймер. Комбинирането на холинестеразна инхибиторна активност (имитираща съществуващи лекарства като Донепезил) с мелатонинова активност е силно перспективен подход, тъй като мелатонинът е известен с неврпротективните си, антиоксидантни и циркадни регулаторни свойства, често нарушени при болестта на Алцхаймер. Изследването на мелатониновия дефицит като модел допълнително задълбочава разбирането за патофизиологията на болестта.

В този контекст намирам, че тематиката, методологията, работната постановка са изключително актуални и отразяват високото ниво на научно-изследователските практики на партньорските екипи, допринесли за разработката на дисертационния труд.

СТРУКТУРА И ОФОРМЛЕНИЕ

Структурата на дисертацията следва приетите академични стандарти, включвайки Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане, Изводи, Приноси и Библиография. Работата е написана на 111 стандартни машинописни страници, онагледена с 24 фигури и 1 таблица.

Дисертационният труд е високосъдържателен и конструиран по правилата на подобни трудове. На пръв поглед изглежда класическо рутинно изследване на новосинтезирани съединения. При по-внимателен прочит обаче, става ясно, че на базата на сериозни познания на патогенезата на болестта на Алцхаймер, с помощта на съвременната обработка чрез иновационни софтуерни подходи за определяне нивата на сигналните молекули при биохимичния анализ, са изведени полиномиални уравнения от трети порядък спрямо стандартите. С това този труд надхвърля класическите представи за дисертационен труд за ОНС "Доктор".

Литературният обзор се отличава с целенасоченост, поставяйки работата в контекста на най-новите достижения в неврофармакологията. Основните предимства са:

◇ Насоченост към мулти-таргетна терапия (MTDLs): Обзорът успешно демонстрира необходимостта от преминаване от моно-таргетни към мулти-таргетни стратегии в лечението на болестта на Алцхаймер. Чрез задълбочен анализ се обосновава хибридният подход, комбиниращ холинергичната сигнализация с мелатониновата невропротекция, като модерна и научно издържана концепция.

◇ Обхващане на патогенетичните връзки: Обзорът детайлно анализира връзката между холинергичния дефицит, амилоидната каскада и нарушенията в циркадния ритъм - мелатониновия дефицит при болестта на Алцхаймер. Това показва отлично познаване на

патофизиологията и предоставя ясна обосновка за избора на комбинирания животински модел (пинеалектомия + -амилоид).

◇ Изясняване на молекулярни пътища: Обзорът се фокусира върху съвременните знания за сигналните пътища, регулиращи синаптичната пластичност и неврогенезата (напр. ERK/CREB), което логически свързва химическия дизайн на новите молекули с очаквания им механизъм на действие.

◇ Цитирана е релевантна и актуална научна литература, само 8 автора са от периода преди 2000 год., което е безспорно свидетелство, че дисертацията доразвива и надгражда върха на съществуващото досега научно познание в областта.

Цели и задачи

Както целите, така и хипотезата са замислени изключително професионално, отговарят на най-високите научни стандарти и са изпълнени с голяма сложност. В стремежа си обаче да мотивира избора на новосинтезираните производни, тук докторантката е избързала да изведе на преден план заслугите на проф. Стоянова и екипа ѝ. Позволявам си да отправя конструктивна препоръка за по-добра експозиция в писмения текст. За да се постигне максимална научна строгост, целта на дисертацията е добре да бъде формулирана като единно, всеобхватно изречение, което да носи тежестта и да капсулира целия смисъл и логика на проучването. Би се постигнало по-голяма яснота и прегледност, ако единната цел бъде разбита на 2-3 подцели.

Заглавието по безспорен начин дава широкия обхват на изследването, докато целта в последствие се доразвива логически на постижими и измерими стъпки - поставените задачи, които да гарантират изпълнението на темата.

От заглавието и насочеността на работата, поставените цели могат да бъдат оценени като амбициозни, но напълно постижими. Основните задачи според мен включват:

1. Апробиране на експериментален модел, имитиращ състояния на мелатонинов дефицит (чрез пинеалектомия) и интрацеребровентрикуларна инфузия на олигопептида A β ₁₋₄₂, като ключови аспекти на болестта на Алцхаймер.
2. *In vitro* оценка на холинестеразната инхибиторна активност.
3. *In vivo* неврофармакологични проучвания (Y-лабиринт, тест за разпознаване на обект и тест за локация на обект) върху адекватни животински модели на болестта на Алцхаймер и мелатонинов дефицит.
4. Проучване на молекулярни механизми (напр. MT/ERK/CREB сигнализация), чрез които селектираните съединения осъществяват своя протективен ефект.

Този обхват демонстрира комплексен и задълбочен подход, обхващащ както химичната, така и биологичната валидация на новосинтезираните молекули.

МАТЕРИАЛИ, МЕТОДОЛОГИЯ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДИЗАЙН

Методологията на дисертационния труд е изключително солидна, многостепенна и изцяло съответства на най-добрите съвременни практики за предклинични неврофармакологични проучвания.

1. ЖИВОТИНСКИ МОДЕЛ (ПАТОГЕНЕТИЧНА РЕЛЕВАНТНОСТ): Използваният комбиниран експериментален модел върху плъхове е строг и високорелевантен. Чрез пинеалектомия (премахване на епифизата) се създава модел на ендегенен мелатонинов дефицит и нарушен циркаден ритъм, състояния, силно асоциирани с прогресията на болестта на Алцхаймер. Последващата инфузия на амилоид ($A\beta_{1-42}$) в хипокампуса (ключов център за паметта) възпроизвежда амилоидната невротоксичност. Този двуфакторен модел е значително по-комплексен и патогенетично издържан от моно-моделите.

2. НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНА ОЦЕНКА:

✓ Поведенчески тестове: Приложени са валидирани поведенчески тестове за обективно измерване на пространствената и асоциативната памет и когнитивния дефицит.

✓ Молекулярна оценка: Използвани са модерни молекулярно-биологични методи за изясняване на молекулярния механизъм (сигналните пътища), както и определяне на ензимните и неензимни маркери на оксидативния стрес, който е ключов патогенетичен компонент в развитието на болестта на Алцхаймер. В такова състояние абнормното генериране на свободни радикали, предназначени да убиват патогени, изчерпва антиоксидантната защита на невроните и ги прави силно уязвими на увреждане. Тук идва на помощ мелатонинът и неговите производни. С техния радикал-улавящ потенциал те спомагат за овладяване на оксидативните увреждания, което е част от невропротективния им ефект.

СТАТИСТИЧЕСКА ДОСТОВЕРНОСТ: Изключително важно е, че резултатите са подложени на задълбочен и коректен статистически анализ. Използването на подходящи методи (напр. ANOVA с последващи post-hoc тестове) гарантира статистическа достоверност на изведените разлики между експерименталните групи и контролите. Това е неоспоримо доказателство за коректността и високия стандарт на експерименталния дизайн, изпълнение и статистическа обработка.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Обобщението на оригиналността, иновативността и силните страни на дисертационния труд ми позволяват да изтъкна на преден план факта, че е осъществено сериозно преодоляване на ограниченията на конвенционалните изследвания в областта на болестта на Алцхаймер. Новостта се корени в два основни, взаимосвързани аспекта:

1. **МОДЕЛНА НОВОСТ** (Патогенетична релевантност): Използван е оригинален и комплексен животински модел, който е много по-близък до човешката патология. Комбинацията от пинеалектомия (симулираща дефицит на мелатонин и нарушен циркаден ритъм) и интрахипокампадна инфузия на A β ₁₋₄₂ е нов подход за едновременно изследване на когнитивната дисфункция и циркадно-холинергичните нарушения.
2. **МЕХАНИЗМОВА НОВОСТ** (сигнални пътища): За първи път е детайлно изяснен молекулярният механизъм, по който най-активните хибриди осъществяват своя невропротективен и паметовъзстановяващ ефект. Доказаното модулиране на MT/ERK/CREB сигналния път в хипокампуса е оригинален факт, който осигурява солидна молекулярна обосновка за терапевтичното приложение на новосинтезираните съединения.

Научни приноси

Дисертационният труд генерира съществени и оригинални научни приноси, които имат потенциал да повлияят бъдещото разработване на лекарства за болестта на Алцхаймер.

Ключови научни приноси:

1. **РАЗРАБОТВАНЕ НА НОВ КЛАС МУЛТИ-ТАРГЕТНИ АГЕНТИ:** Доказан е успешният синтез и биологична активност на хибридни молекули (сулфанил хидразони и мелатонинови производни), които функционират като ефективни MTDLs. Този подход представлява значителна стъпка напред в сравнение с моно-таргетната терапия.
2. **ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ВОДЕЩИ СЪЕДИНЕНИЯ С ВИСОКА ЕФИКАСНОСТ *in vivo*:** Идентифицирани са конкретни нови съединения, които не само успяват да обърнат предизвикания когнитивен дефицит в сложния модел на болестта на Алцхаймер и мелатонинов дефицит, но и показват значимо превъзходство по ефикасност спрямо използваните положителни контроли (напр. Донепезил или чист Мелатонин).
3. **ИЗЯСНЯВАНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНИЯ МЕХАНИЗЪМ НА НЕВРОПРОТЕКЦИЯ:** Най-значимият принос е детайлното изясняване на механизма на действие на новосинтезираните вещества. Експресията

на ключови протеини в хипокампуса (напр. свързани с MT/ERK/CREB сигнализацията), позволява директно изясняване на механизма на невропротективно действие.

Доказано е, че невропротективният и памето-възстановяващ ефект се осъществяват чрез модулиране на MT/ERK/CREB сигналния път в хипокампуса, паралелно с овладяване на оксидативните увреждания. Активирането на този път е критично за синаптичната пластичност и дългосрочната памет, като това установяване осигурява солидна биохимична основа за терапевтичния потенциал на молекулите.

Личният принос на докторанта Петя Петкова Иванова е значителен и се изразява в овладяване на ключови етапи от експерименталната част на дисертационния труд, анализ и обработка на получените резултати. Като особено силни и оригинални елементи оценявам:

ПРОВЕЖДАНЕ НА *IN VIVO* МОДЕЛИ: Извършването на сложните хирургични процедури (пинеалектомия) за създаване на модела с мелатонинов дефицит, както и стереотаксично инфузиране на амилоид A β ₁₋₄₂ за индукция на патология, което представлява висока експертиза в областта на поведенческата невробиология.

ИЗПЪЛНЕНИЕ И АНАЛИЗ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИ ТЕСТОВЕ, които покриват основните аспекти на паметта, увредени от болестта на Алцхаймер. Резултатите от поведенческите експерименти и последващият статистически анализ на данните за оценка на когнитивния дефицит е сериозно доказателство за терапевтичния ефект на новосинтезираните молекули. Получените резултати са неоспоримо доказателство, че съединенията възстановяват пространствената навигация краткосрочната оперативна, разпознавателна и пространствена памет.

КОНСТРУКТИВНИ ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРОДЪЛЖАВАНЕ И ЗАДЪЛБОЧАВАНЕ НА НАСТОЯЩИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Както всяка една отлична работа, така и тази дисертация поставя на дневен ред множество въпроси, генерира нови идеи и перспективи за последващи по-задълбочени изследвания.

Определено считам, че получените в настоящия труд данни имат не само важно научно значение, но те представляват ценна фундаментална платформа за следващи научни изследвания, тъй като валидират нов подход и предоставят водещи съединения за по-нататъшна разработка. Дисертацията осъществява мост между химичния синтез и предклиничното развитие на лекарства срещу болестта на Алцхаймер. Валидирана е хипотезата за мулти-таргетната терапия като работещ подход. Доказва се, че съчетаването на холинестеразна инхибиция и мелатонинова активност е синергично и ефективно решение при сложен модел на болестта на Алцхаймер. Конкретните новосинтезирани съединения не са просто нови молекули (хибриди),

показали най-добра ефективност при овладяване на патогенезата при експерименталния модел на болестта на Алцхаймер, а минават в категорията на лекарствени кандидати, подходящи за следващите фази на предклинично изпитване. И не на последно място, изясняването на MT/ERK/CREB сигналния път дава на неврофармаколозите специфична мишена за оптимизация, а на химиците-синтетици - подбор на синтези в молекулния дизайн, насочени към усилване на тази молекулярна модулация. Това заключение извежда изследването от фазата на "откриване на цел" във фазата на "откриване и оптимизация на водещо съединение" (Drug Discovery and Lead Optimization).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд представлява сериозно научно постижение, което валидира нова терапевтична концепция в областта на неврофармакологията. Темата е авангардна, методологията е строга, а резултатите са доказани чрез публикуване на три статии в авторитетно реферирано научно списание, ситуирано в квантил Q1 (Int J Mol Sci), което е неоспоримо доказателство за коректността и високия стандарт на експерименталния дизайн, изпълнение и представяне. Забелязах 12 цитата на публикациите по дисертацията, които докторантката не е приложила в документите по процедурата.

Считам, че горе изложеното ми дава основание да гласувам положително и да препоръчам убедено на колегите от Научното жури, в съответствие със ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане, на докторант Петя Петкова Иванова да бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ по Професионално направление 7.1 Медицина, специалност Фармакология.

19.10.2025

София

Проф. д-р Милка Милева

REVIEW

of a dissertation for the award of the educational and scientific degree "Doctor"

to part-time doctoral student Petya Petkova Ivanova

Institute of Neurobiology - Bulgarian Academy of Sciences,

field "Behavioral Neurobiology"

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

Professional field: 7.1 Medicine, specialty Pharmacology

SCIENTIFIC SUPERVISORS:

Prof. Yana Chekalarova, Ph.D. - Bulgarian Academy of Sciences, Institute of Neurobiology;

Prof. Dr. Violina Stoyanova, Ph.D. - Faculty of Pharmacy, Medical University - Sofia

By Prof. Milka Milcheva Mileva, Ph.D. - Institute of Microbiology "Stephan Angeloff" - Bulgarian Academy of Sciences

This review has been prepared in accordance with the requirements of the Law on the Protection of Scientific and Technical Research of the Republic of Bulgaria, the regulations for its implementation and the requirements for reviewers of the Bulgarian Academy of Sciences, as well as the European Standards for Reviewing Doctoral Theses.

I do not know the doctoral student personally, I have no common publications with her and I am not in a conflict of interest, according to the law.

RELEVANCE AND SIGNIFICANCE OF THE PROBLEM

The topic of the dissertation is extremely relevant and has high scientific and social significance. Alzheimer's disease remains a global health and social problem, unfortunately, with limited therapeutic options. The dissertation addresses the modern strategy for developing multi-targeted ligands (Multi-Target-Directed Ligands, MTDLs), which can simultaneously affect several pathogenetic pathways of Alzheimer's disease. Combining cholinesterase inhibitory activity (mimicking existing drugs such as Donepezil) with melatonin activity is a highly promising approach, since melatonin is known for its neuroprotective, antioxidant and circadian regulatory properties, which are often impaired in Alzheimer's disease. The study of melatonin deficiency as a model further deepens the understanding of the pathophysiology of the disease.

In this context, I find that the topic, methodology, and work setting are extremely relevant and reflect the high level of the research practices of the partner teams that contributed to the development of the dissertation.

STRUCTURE AND FORMATION

The structure of the dissertation follows accepted academic standards, including Introduction, Literature Review, Aim and Objectives, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Contributions and Bibliography. The work is written on 111 standard typewritten pages, illustrated with 24 figures and 1 table.

The dissertation is highly informative and constructed according to the rules of similar works. At first glance, it seems to be a classic routine study of newly synthesized compounds. However, upon closer reading, it becomes clear that based on serious knowledge of the pathogenesis of Alzheimer's disease, with the help of modern processing through innovative software approaches for determining the levels of signaling molecules in biochemical analysis, polynomial equations of the third order have been derived in relation to the standards. This work thus goes beyond the classic ideas of a dissertation for the Doctor's degree.

- ◇ The literature review is distinguished by its purposefulness, placing the work in the context of the latest advances in neuropharmacology. The main advantages are:
 - ◇ Towards multi-targeted therapies (MTDLs): The review successfully demonstrates the need to move from mono-targeted to multi-targeted strategies in the treatment of Alzheimer's disease. Through an in-depth analysis, a hybrid approach combining cholinergic signaling with melatonin neuroprotection is justified as a modern and scientifically sound concept.
 - ◇ Understanding the Pathogenetic Links: The review provides a detailed analysis of the relationship between cholinergic deficiency, the amyloid cascade, and circadian rhythm disturbances/melatonin deficiency in Alzheimer's disease. This demonstrates an excellent understanding of the pathophysiology and provides a clear rationale for the choice of the combined animal model (pinealectomy + -amyloid).
 - ◇ Elucidation of molecular pathways: The review focuses on current knowledge of signaling pathways regulating synaptic plasticity and neurogenesis (e.g. ERK/CREB), which logically connects the chemical design of new molecules to their expected mechanism of action.
 - ◇ Relevant and current scientific literature is cited, only 8 authors are from the period before 2000, which is indisputable evidence that the dissertation further develops and builds on the peak of the existing scientific knowledge in the field.

GOALS AND OBJECTIVES

Both the objectives and the hypothesis are conceived extremely professionally, meet the highest scientific standards and are filled with great complexity. However, in her effort to motivate the choice of the newly synthesized derivatives, here the doctoral student hastened to bring to the fore the merits of Prof. Stoyanova and her team. I would like to make a constructive recommendation for a better exposition in the written text. In order to achieve maximum scientific rigor, the aim of the dissertation should be formulated as a single, comprehensive sentence that carries the weight and encapsulates the entire meaning and logic of the study. Greater clarity and overview would be achieved if the single aim were broken down into some sub-goals.

The title undoubtedly gives the broad scope of the study, while the goal is subsequently developed logically into achievable and measurable steps - the tasks set to ensure the implementation of the topic.

From the title and the focus of the work, the goals set can be assessed as ambitious, but completely achievable. The main tasks in my opinion include:

1. Testing an experimental model mimicking states of melatonin deficiency (via pinealectomy) and intracerebroventricular infusion of the oligopeptide A β ₁₋₄₂, as key aspects of Alzheimer's disease.
2. *In vitro* evaluation of cholinesterase inhibitory activity.
3. *In vivo* neuropharmacological studies (Y-maze, object recognition test and object location test) on adequate animal models of Alzheimer's disease and melatonin deficiency.
4. Study of molecular mechanisms (e.g. MT/ERK/CREB signaling) through which the compounds exert their protective effect.

This scope demonstrates a complex and in-depth approach, encompassing both chemical and biological validation of molecules.

MATERIALS, METHODOLOGY AND EXPERIMENTAL DESIGN

The methodology of the dissertation is extremely solid, multi-level and fully consistent with the best contemporary practices for preclinical neuropharmacological studies.

1. ANIMAL MODEL (PATHOGENETIC RELEVANCE):

- The combined experimental rat model used is rigorous and highly relevant. Pinealectomy (removal of the pineal gland) creates a model of endogenous melatonin deficiency and disrupted circadian rhythm, conditions strongly associated with the progression of Alzheimer's disease. Subsequent infusion of

amyloid (A β ₁₋₄₂) into the hippocampus (a key memory center) reproduces amyloid neurotoxicity. This two-factor model is significantly more complex and pathogenetically robust than the mono-models.

- **NEUROPHARMACOLOGY EVALUATION:** Behavioral tests: Validated behavioral tests (e.g., Morris Water Maze, Passive Avoidance Test) were applied to objectively measure spatial and associative memory and cognitive deficits.

- **Molecular assessment:** Molecular assessment: Modern molecular biological methods have been used to elucidate the molecular mechanism (signaling pathways), as well as to determine the enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress, which is a key pathogenetic component in the development of Alzheimer's disease. In such a state, the abnormal generation of free radicals, intended to kill pathogens, depletes the antioxidant defense of neurons and makes them highly vulnerable to damage. This is where melatonin and its derivatives come to the rescue. With their radical-scavenging potential, they help to control oxidative damage, which is part of their neuroprotective effect.

STATISTICAL RELIABILITY: It is extremely important that the results are subjected to thorough and correct statistical analysis. The use of appropriate methods (e.g. ANOVA with subsequent post-hoc tests) guarantees statistical reliability of the inferred differences between the experimental groups and the controls. This is indisputable evidence of the correctness and high standard of the experimental design, execution and statistical processing.

RESULTS AND DISCUSSION

The summary of the originality, innovation and strengths of the dissertation work allows me to highlight the fact that a serious overcoming of the limitations of conventional research in the field of Alzheimer's disease has been achieved. The novelty is rooted in three main, interrelated aspects:

NEW MODEL (Pathogenetic relevance): An original and complex animal model was used, which is much closer to human pathology. The combination of pinealectomy (simulating melatonin deficiency and disrupted circadian rhythm) and intrahippocampal infusion of is a novel approach to simultaneously study cognitive dysfunction and circadian-cholinergic disorders.

MECHANICAL NOVELTY (signaling pathways): For the first time, the molecular mechanism by which the most active hybrids exert their neuroprotective and memory-restoring effect has been elucidated in detail. The proven modulation of the MT/ERK/CREB signaling pathway in the hippocampus is an original fact that provides a solid molecular rationale for the therapeutic application of the newly synthesized compounds.

SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS

The dissertation work generates substantial and original scientific contributions that have the potential to influence future drug development for Alzheimer's disease.

KEY SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS:

DEVELOPMENT OF A NEW CLASS OF MULTI-TARGET AGENTS: The successful synthesis and biological activity of hybrid molecules (sulfanyl hydrazones and melatonin derivatives) that function as effective MTDLs has been demonstrated. This approach represents a significant step forward compared to mono-targeted therapy.

IDENTIFICATION OF LEADING COMPOUNDS WITH HIGH EFFICACY *IN VIVO*: Specific new compounds have been identified that not only manage to reverse the induced cognitive deficit in the complex model of Alzheimer's disease and melatonin deficiency, but also show significant superiority in efficacy over the positive controls used (e.g., donepezil or pure melatonin).

CLARIFICATION OF THE MOLECULAR MECHANISM OF NEUROPROTECTION: The most significant contribution is the detailed elucidation of the mechanism of action of the newly synthesized substances. Modern molecular biological methods (Western Blot, PCR) were used to quantify the expression of key proteins in the hippocampus (e.g., those related to MT/ERK/CREB signaling), which allows direct elucidation of the mechanism of neuroprotective action.

It has been shown that the neuroprotective and memory-restoring effects are mediated by modulating the MT/ERK/CREB signaling pathway in the hippocampus, in parallel with the management of oxidative damage. Activation of this pathway is critical for synaptic plasticity and long-term memory, and this finding provides a solid biochemical basis for the therapeutic potential of the molecules.

PERSONAL CONTRIBUTION of the doctoral student Petya Petkova Ivanova is significant and is expressed in mastering key stages of the experimental part of the dissertation work, analysis and processing of the obtained results. As particularly strong and original elements I assess:

CONDUCTING *IN VIVO* MODELS: Performing the complex surgical procedures (pinealectomy) to create the melatonin deficiency model, as well as stereotaxic infusion of amyloid A β ₁₋₄₂ to induce pathology, represents a high level of expertise in the field of behavioral neurobiology.

PERFORMANCE AND ANALYSIS OF BEHAVIORAL TESTS, which cover the main aspects of memory impaired by Alzheimer's disease. The results of the behavioral experiments and the subsequent statistical analysis of the data to assess cognitive deficit are serious evidence of the therapeutic effect of

the newly synthesized molecules. The results obtained are indisputable evidence that the compounds restore spatial navigation, short-term operational, recognition and spatial memory.

CONSTRUCTIVE RECOMMENDATIONS FOR CONTINUING AND DEEPENING THE CURRENT RESEARCH

Like any excellent work, this dissertation raises many questions, generates new ideas and perspectives for further in-depth research.

I definitely believe that the data obtained in this work are not only of important scientific importance, but they represent a valuable fundamental platform for further scientific research, as they validate a new approach and provide lead compounds for further development. The dissertation bridges the gap between chemical synthesis and preclinical development of drugs against Alzheimer's disease.

The hypothesis of multi-target therapy as a working approach is validated. It is proven that the combination of cholinesterase inhibition and melatonin activity is a synergistic and effective solution in a complex model of Alzheimer's disease. The specific newly synthesized compounds are not just new molecules (hybrids) that have shown the best efficiency in controlling the pathogenesis of the experimental model of Alzheimer's disease, but they fall into the category of drug candidates suitable for the next phases of preclinical testing. Last but not least, elucidation of the MT/ERK/CREB signaling pathway provides neuropharmacologists with a specific target for optimization and synthetic chemists with a selection of syntheses aimed at enhancing this molecular modulation. This conclusion moves the research from the "target discovery" phase to the "Drug Discovery and Lead Optimization" phase.

CONCLUSION

The dissertation represents an excellent scientific achievement that validates a new therapeutic concept in the field of neuropharmacology. The topic is cutting-edge, the methodology is rigorous, and the results have been proven by publishing three articles in an authoritative refereed scientific journal, located in the Q1 quartile (Int J Mol Sci), which is indisputable evidence of the correctness and high standard of the experimental design, execution and presentation. I noticed 12 citations of the publications in the dissertation, which the doctoral student did not apply in the documents of the procedure.

I believe that the above gives me reason to vote positively and to recommend with conviction to my colleagues from the Scientific Jury, in accordance with the ZRASRB and the Regulations for its implementation, that doctoral student Petya Petkova Ivanova be awarded the educational and scientific degree "Doctor" in Professional Field 7.1 Medicine, specialty Pharmacology.

19.10.2025

Sofia

Prof. Milka Mileva, Ph.D.