

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема:

**„Невропротективни механизми в ефектите на Елаговата киселина
върху експериментален модел на Паркинсонова болест при плъхове“**

За присъждане на общообразователна и научна степен „ДОКТОР“

Докторант: Симона Александрова Александрова

Българска академия на науките

Институт по невробиология

Научен ръководител: Проф. Д-р Любка Танчева, ИНБ-БАН

Изготвил рецензията: - доц. д-р Мария Папазова, дф

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд е написан на 156 стандартни машинописни страници. Съдържа както следва: съдържание и използвани съкращения -3 стр.; въведение - 2 стр.; литературен обзор - 56 стр.; цел и задачи, материали и методи - 10 стр.; резултати, обсъждане и обобщение на резултатите – 25 стр.; изводи, приноси, публикации и представяния – 3 стр. и библиография - 48 страници. Онагледен е с 12 фигури и 3 таблици. Библиографската справка обхваща 12 български и 356 чужди автори.

Работата е посветена на фармакологично проучване на ефектите на естествената елагова киселина от нар – природен полифенол с широк спектър на фармакологична активност - върху експериментален модел на Паркинсонова болест.

В последните десетилетия се наблюдава засилен интерес към лечебните продукти от природни източници. Само за периода 1981 – 2006 г., благодарение на усилията за разработване на натурални лекарствени

средства, в медицинската лечебна практика са въведени нови естествени биологичноактивни препарати, които съставляват 63% от всички регистрирани фармакотерапевтични агенти. В тази връзка е необходимо да отбележим, че екстрактите от плода, кората, семките и др. части на нара се използват от векове в традиционната китайска медицина, в аюрведическите и редица други източни естествени лечебни практики. Известно е ефективното приложение на екстрактите от нар за предпазване от и облекчаване на диабет, атеросклероза, хипертония, хиперлипидемия, някои видове рак, язва и заболявания на храносмилателната система, както и при различни вирусни инфекции. В последните десетилетия, научните търсения за потенциални благоприятни профилактични и лечебни ефекти на нара основателно се насочват и към групата на невродегенеративните заболявания, които показват тревожен статистически ръст и представляват изключително сериозен медицински и социален проблем.

Болестта на Паркинсон е второто най-често срещано социално значимо заболяване след Болестта на Алцхаймер. В продължение на десетилетия, редица научни екипи се опитват да разработят ефективни и безвредни превантивни и терапевтични средства за това специфично невродегенеративно заболяване, но за момента усилията им не са увенчани със значим успех.

Болестта на Паркинсон се характеризира с протрахирано начало, мултифакторна етиология и патогенеза и разнолика клинична картина при отделните пациенти, което затруднява откриването на универсални ефективни терапевтични продукти. На този етап, наличните медикаментозни средства са насочени само за симптоматичното повлияване на невродегенеративните изменения и не се отразяват съществено върху хода на

болестния процес. Ето защо, откриването на биологично-активни вещества с потенциални ефекти за превенция и терапия на невродегенеративните увреждания, в т.ч. и Болестта на Паркинсон, е от първостепенно значение за медицинската практика. В този смисъл, темата на дисертационния труд е изключително актуална. Това е добре изтъкнато във въведението, като умело е наблегнато и върху лечебното действие на нара и в частност на елаговата киселина. Очертан е фармакологичния спектър на действие на елаговата киселина на базата на досегашните експериментални проучвания и е подчертан фактът, че в областта на неврофармакологията липсват съществени данни за нейната биологична активност при болестта на Паркинсон. Дисертантката описва много аргументирано необходимостта от провеждане на фармакологични изследвания за изучаване ефектите на елаговата киселина при експериментален модел на Паркинсон, които могат да допринесат от една страна за косвено допълване на съществуващите научни данни за патогенезата на страданието и от друга - за разкриването на нови възможни естествени решения за превенция или забавяне на еволюцията на това инвалидизиращо невродегенеративно увреждане.

Много добро впечатление прави структурирането и обобщението на всички систематизирани научни факти в рамките на изчерпателния литературен обзор, който ясно очертава необходимостта от мултитаргетен подход за превенция и лечение на БП, за да бъдат повлияни комплексно многобройните й патогенетични механизми. Цитирани са съвсем уместно предишните изследвания на научния колектив, демонстриращи данни за плурипотентен невропротективен ефект на елаговата киселина при гризачи с експериментален модел на скополаминова амнезия, включващ многокомпонентен механизъм на действие чрез антиоксидантни,

антихолинестеразни и допамин-модулиращи свойства. Настоящият дисертационен труд се явява естествено продължение на тези изследвания.

Онагледяването (вкл. с цветни фигури – виж стр. 23, 24, 29, 35, 36 и пр.) още в тази първа основна част на дисертационния труд, допринася съществено за цялостното впечатление от работата на маг. фарм. Александрова и показва задълбочените ѝ познания както в областта на етиологията, патогенезата и възможните терапевтични възможности на болестта на Паркинсон, така и на фармакологичната характеристика на природните полифеноли и в частност на елаговата киселина. Значително се улеснява и възможността за запознаване на четящия с многообразната фактология. Счита за уместно да препоръчам след публичната защита, докторантката да оформи литературния обзор като отделен монографичен труд.

Изчерпателният литературен обзор е база за адекватно формулиране на научната цел и произтичащите от нея задачи: създаване на подходящ експериментален дизайн за охарактеризиране на евентуалните антиоксидантни и невропротективни ефекти на елаговата киселина при плъхове с експериментален токсичен 6ОНДА-ов модел на Паркинсонова болест, който се приема за верифициран модел на това невродегенеративно заболяване.

В края на литературния обзор е формулирано точно основанието за планираните научни изследвания, описани са ясно конкретните експериментални цели и задачи и са разгледани в детайли всички използвани експериментални материали и методи. В глава „Материали и методи“ експерименталният материал е много добре описан и класифициран, дадени са всички видове експериментални протоколи, химикали и реагенти. Правилно подбрани и точно охарактеризирани са предвидените основни

експериментални направления с включените във всяко от тях конкретни изследвания. Убедително са доказани предимствата на подобрения експериментален модел. Изключително добро впечатление прави използването на „Анализ на главните компоненти“ или т.н. „Клъстерен анализ“, за установяване на прилики и разлики между отделните експериментни групи плъхове, както и за идентифициране на основните връзки между променливите, отговорни за вариабилността на анализирани данни.

В пета глава са представени детайлно, различните групи научни данни (поведенчески и биохимични), получени в резултат от проведените фармакологични експерименти с елагова киселина върху плъхове с експериментален модел на БП. И в тази глава на дисертационния труд дисертантката е вложила усилия за доброто онагледяване на всички получени резултати. Всички фигури, схеми и таблици са точни и лесни за възприемане от читателя, поради добрата подредба и оформяне на легендите под тях. Това е особено важно при сравняването на различните проследявани параметри. Дискусията следва хода на получените експериментални резултати. Стилът е ясен, конкретен и базиран на фактите от литературния обзор, което говори за добра информираност на докторантката и за способността ѝ да се ориентира правилно в многото получени резултати, да извлече есенцията и да формулира правилно произтичащите от дискусията изводи и приноси. От прецизно представените резултати следват логично оформените изводи и приноси, които ясно подчертават несъмнената научна и научно-практическа стойност на дисертационния труд.

Установено е, че ЕК притежава изразени невропротективни ефекти върху плъхове с модел на унилатерална 6-OHDA-индуцирана Болест на Паркинсон.

Получени са конкретни данни за многофакторни, комплексни механизми на установените защитни ефекти на ЕК върху плъхове с експериментална БП:

- Мощно антиоксидантно действие, което води до стимулиране на естествената антиоксидантна защита;

- Повлияване на допаминовите нива в мозъка на плъховете с експериментална БП, третирани с ЕК.

Считам данните за способността на ЕК да увеличава допаминовите нива в мозъка на плъховете с експериментална БП, което може да доведе до забавяне на прогресията на това тежко невродегенеративно заболяване, за съществени от научна и научно-практическа гледна точка. Интерес представлява и фактът за селективно действие на ЕК, върху предимно увредената хемисфера, където нивата на оксидативния стрес са чувствително по-високи от тези на интактната хемисфера. Сигнификантна промяна в допаминовите нива също е установена повече ипсилатерално при животните, претретирани с ЕК. Последният извод за потвърдителни резултати от проведения клъстерен анализ, който позволява да се интегрират поведенческите и биохимичните данни, е особено важен за оформяне на цялостната картина на научните изследвания и за утвърждаване на заключението за мултитаргетен механизъм на превантивните свойства на елаговата киселина, която действително забавя прогресията на БП в конкретните експериментални условия.

Въз основа на получените резултати и направените изводи, в дисертационния труд са изведени 4 основни приноса:

1. За първи път се установява невропротективното действие на ЕК върху унилатерален 6-OHDA-модел на БП, при нейното превантивно приложение.

2. Получени са оригинални данни за пряка корелация между възстановяването на допаминергичната система, антиоксидантния ефект и подобряването на нервномускулната координация при плъхове, вследствие превантивното прилагане на ЕК.

3. За първи път се установява изразена селективна активност на ЕК върху увредената мозъчна хемисфера в сравнение с интактната, което е видно от разликите между променените показатели на ОС и на допаминовите нива в двете хемисфери.

4. Представят се за първи път интегрирани поведенчески и биохимични данни, в подкрепа на заключението, че ЕК проявява едновременно комплексни невропротективни свойства и чрез различни биохимични механизми може да забави прогресията на БП в експериментални условия при плъхове.

Бих искала да подчертая моята обоснова на качествата на дисертационния труд висока оценка на тематиката, подобрите експериментални методи, проведените сравнителни изследвания, вложените усилия и труд, цялостния научно-практически принос на работата на докторант Симона Александрова и на научния ѝ ръководител. Прекрасно впечатление прави и оформянето на автореферата към дисертацията, структуриран и изготвен според съответните критерии и изисквания и много добре онагледен. Цялостното ми отлично впечатление се подсили и от факта,

че Александрова се е съобразила с първоначалните ми забележки за отстраняване на известни стилови неточности и правописни грешки. В окончателния вариант на труда те са изцяло коригирани.

ОЦЕНКА НА КРИТЕРИИТЕ В СЪОТВЕТСТВИЕ СЪС ЗРАСРБ И ПРАВИЛНИК ЗА ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ НА ИНБ – БАН.

Във връзка с дисертационния труд, докторантката представя 5 публикации, на 3 от които е първи автор. На публикуваните статии са намерени общо 24 цитирания. Представени са участия в 12 научни форума, свързани с дисертационния труд – 1 национален и 11 международни в страната и чужбина.

От приложените материали по процедурата става ясно, че е събран необходимият брой точки, в съответствие със ЗРАСРБ и правилника на ИН за неговото прилагане.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за рецензия Дисертационен труд представлява актуално, интересно и оригинално проучване на фармакологичните свойства на природния полифенол ЕГ върху експериментален модел на БП у плъхове. Считаю, че получените нови резултати за мултитаргетен невропротективен механизъм на въздействие на ЕГ в конкретния експериментален модел, не само разширяват фармакобиологичния паспорт на този доказан от древността природен лечител, но представляват ценна находка и основа за бъдещи изследвания в посока на разработване на ефективни естествени лекарства за превенция и лечение на болестта на Паркинсон.

Всичко това ми дава основание убедено да предложа на всички членове на научното жури да гласуват положително за присъждане на маг.

фарм. Симона Александрова Александрова общообразователната и научна
степен „ДОКТОР“.

27 . 02 .2023 г.

София

Доц. Д-р Мария Папазова, дф

DISSERTATION REVIEW

on topic

"Neuroprotective Mechanisms in the Effects of Ellagic Acid on an Experimental Model of Parkinson's Disease in Rats"

For awarding general educational and scientific degree "DOCTOR"

Doctoral student: **Simona Alexandrova Alexandrova**

Bulgarian Academy of Sciences

Institute of Neurobiology

Research supervisor: Prof. Dr. Lyubka Tancheva, ISB-BAS

The review was prepared by: Associate Professor Maria Papazova, Ph.D

The dissertation submitted to me for review is written in 156 standard typewritten pages. Contains as follows: table of contents and abbreviations used -3 pages; introduction - 2 pages; literary review - 56 pages; purpose and tasks, materials and methods - 10 pages; results, discussion and summary of the results - 25 pages; conclusions, contributions, publications and presentations - 3 pages and bibliography - 48 pages. Illustrated with 12 figures and 3 tables. The bibliographical reference covers 12 Bulgarian and 356 foreign authors.

The work is devoted to a pharmacological study of the effects of natural ellagic acid from pomegranate - a natural polyphenol with a wide spectrum of pharmacological activity - on an experimental model of Parkinson's disease.

In recent decades, there has been an increased interest in medicinal products from natural sources. Only for the period 1981 - 2006, thanks to the efforts to develop natural medicines, new natural biologically active preparations were introduced into medical treatment practice, which make up 63% of all registered pharmacotherapeutic agents.

In this regard, it is necessary to note that the extracts of the fruit, bark, seeds, etc. Pomegranate parts have been used for centuries in traditional Chinese medicine, Ayurvedic and a number of other Eastern natural healing practices. Pomegranate extracts are known to be effective in

preventing and alleviating diabetes, atherosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, certain types of cancer, ulcers and diseases of the digestive system, as well as acute viral infections.

In recent decades, scientific searches for potential beneficial prophylactic and curative effects of pomegranate have rightly focused on the group of neurodegenerative diseases, which show an alarming statistical growth and represent an extremely serious medical and social problem.

Parkinson's disease is the second most common socially significant disease after Alzheimer's disease. For decades, a number of scientific teams have tried to develop effective and harmless preventive and therapeutic agents for this specific neurodegenerative disease, but so far their efforts have not been crowned with significant success.

Parkinson's disease is characterized by a protracted onset, multifactorial etiology and pathogenesis, and a diverse clinical picture in individual patients, which makes it difficult to find universally effective therapeutic products. At this stage, the available medications are aimed only at the symptomatic impact of neurodegenerative changes and do not significantly affect the course of the disease process. Therefore, the discovery of biologically active substances with potential effects for the prevention and therapy of neurodegenerative damages, including and Parkinson's disease, is of paramount importance to medical practice.

In this sense, the topic of the dissertation is extremely relevant. This is well pointed out in the introduction, skillfully emphasizing the medicinal effects of the pomegranate and ellagic acid in particular. The pharmacological spectrum of action of ellagic acid is outlined on the basis of experimental studies so far and the fact that in the field of neuropharmacology there is a lack of substantial data on its biological activity in Parkinson's disease is highlighted.

The doctoral student describes in a very well-argued manner the need to conduct pharmacological studies to study the effects of ellagic acid in an experimental model of Parkinson's, which can contribute, on the one hand, to indirectly complement the existing scientific data on the pathogenesis of the disorder, and on the other hand, to the discovery of

new possible natural solutions to prevent or delay the evolution of this debilitating neurodegenerative disorder.

A very good impression is made by the structuring and summarization of all systematized scientific facts within the comprehensive literature review, which clearly outlines the need for a multi-targeted approach to the prevention and treatment of PD in order to comprehensively influence its multiple pathogenetic mechanisms. The scientific team's previous studies demonstrating evidence of a pluripotent neuroprotective effect of ellagic acid in rodents with an experimental model of scopolamine amnesia, including a model of multicomponent mechanism of action through antioxidant, anticholinesterase and dopamine-modulating properties. The present dissertation work is a natural continuation of these studies.

The illustration (including colored figures - see pages 23, 24, 29, 35, 36, etc.) already in this first main part of the dissertation contributes significantly to the overall impression of the work of M.Sc. Pharm. Alexandrova and shows her in-depth knowledge both in the field of etiology, pathogenesis and possible therapeutic options of Parkinson's disease, as well as in the pharmacological characteristics of natural polyphenols and in particular ellagic acid.

The possibility of familiarizing the reader with the diverse facts is also significantly facilitated. I consider it appropriate to recommend that after the public defense, the doctoral student should form the literature review as a separate monographic work.

The comprehensive literature review is a basis for an adequate formulation of the scientific goal and the resulting tasks: creating an appropriate experimental design to characterize the possible antioxidant and neuroprotective effects of ellagic acid in rats with an experimental toxic 6OHDA model of Parkinson's disease, which is assumed to be verified model of this neurodegenerative disease.

At the end of the literature review, the basis for the planned scientific research is precisely formulated, the specific experimental goals and tasks are clearly described, and all the experimental materials and

methods used are examined in detail. In the Materials and Methods chapter, the experimental material is very well described and classified, all kinds of experimental protocols, chemicals and reagents are given. Correctly selected and precisely characterized are the intended main experimental directions with specific studies included in each of them. The advantages of the selected experimental model have been convincingly proven. It makes an extremely good impression to blurt out "Principal Component Analysis" or the like. "Cluster analysis", to establish similarities and differences between the individual experimental groups of rats, as well as to identify the main relationships between the variables responsible for the variability of the analyzed data. In the fifth chapter, the different groups of scientific data (behavioral and biochemical) obtained as a result of the pharmacological experiments with ellagic acid on rats with an experimental model of BP are presented in detail. And in this chapter of the dissertation, the doctoral student has made efforts to present all the obtained results well. All figures, diagrams and tables are accurate and easy for the reader to perceive, due to the good arrangement and shaping of the legends below them.

This is especially important when comparing different parameters being monitored. The discussion follows the course of the obtained experimental results. The style is clear, concrete and based on the facts of the literature review, which speaks of the doctoral student's well-informedness and her ability to correctly navigate the many results obtained, extract the essence and correctly formulate the conclusions and contributions arising from the discussion.

From the precisely presented results follow the logically formed conclusions and contributions, which clearly emphasize the undoubted scientific and scientific-practical value of the dissertation work.

EA was found to have pronounced neuroprotective effects on rats with a model of unilateral 6-OHDA-induced Parkinson's disease.

Specific data on multifactorial, complex mechanisms of the established protective effects of EC on rats with experimental PD were obtained:

- Powerful antioxidant effect, which leads to the stimulation of natural antioxidant protection;

- Influence of dopamine levels in the brain of rats with experimental BP treated with EA.

I consider the data on the ability of EA to increase dopamine levels in the brain of rats with experimental PD, which can lead to a delay in the progression of this severe neurodegenerative disease, to be significant from a scientific and scientific-practical point of view. Also of interest is the fact of EC's selective action, mainly on the damaged hemisphere, where the levels of oxidative stress are significantly higher than those of the intact hemisphere.

A significant change in dopamine levels was also found more ipsilaterally in EA-pretreated animals. The final finding of confirmatory results from the performed cluster analysis, which allows to integrate the behavioral and biochemical data, is particularly important to shape the overall picture of the scientific studies and to confirm the conclusion of a multi-target mechanism of the preventive properties of ellagic acid that actually slows down the progression of PD in the specific experimental conditions.

Based on the results obtained and the conclusions drawn, 4 main contributions are made in the dissertation work:

1. For the first time, the neuroprotective effect of EC on a unilateral 6-OHDA-model of PD was established, with its preventive application.
2. Original data were obtained on a direct correlation between the restoration of the dopaminergic system, the antioxidant effect and the improvement of neuromuscular coordination in rats, as a result of the preventive application of EA.
3. For the first time, a pronounced selective activity of EA on the damaged cerebral hemisphere compared to the intact one was established, which is evident from the differences between the changed indicators of OS and dopamine levels in the two hemispheres.
4. Integrated behavioral and biochemical data are presented for the first time, supporting the conclusion that EC exhibits both complex neuroprotective properties and through different biochemical

mechanisms can delay the progression of BP in experimental conditions in rats.

I would like to emphasize my high assessment of the topic, the selected experimental methods, the comparative studies, the efforts and work invested, the overall scientific and practical contribution of the work of PhD student Simona Alexandrova and her supervisor, justified by the qualities of the dissertation work. A wonderful impression is also made by the design of the auto-reference to the dissertation, structured and prepared according to the relevant criteria and requirements and very well illustrated. My overall excellent impression was also enhanced by the fact that Aleksandrova complied with my initial remarks to correct known stylistic inaccuracies and spelling errors. In the final version of the work, they have been completely corrected.

ASSESSMENT OF THE CRITERIA IN ACCORDANCE WITH ZRASRB AND RULES FOR TRAINING OF DOCTORAL STUDENTS OF INB - BA.

In connection with the dissertation work, the doctoral student presents 5 publications, 3 of which she is the first author. A total of 24 citations were found on the published articles. Participation in 12 scientific forums related to the dissertation work - 1 national and 11 international in the country and abroad.

From the attached materials on the procedure, it is clear that the required number of points has been collected, in accordance with the ŽRASRB and the rules of the IN for its implementation.

CONCLUSION:

The Dissertation work submitted to me for review is an up-to-date, interesting and original study of the pharmacological properties of the natural polyphenol EG on an experimental model of BP in rats. I believe that the new results obtained for a multi-target neuroprotective mechanism of action of EG in the specific experimental model, not only expand the pharmacobiological passport of this anciently proven natural healer, but represent a valuable finding and a basis for future research in

the direction of developing effective natural medicines for prevention and treatment of Parkinson's disease.

All this gives me reason to confidently suggest to all members of the scientific jury to vote positively for the award of M.Sc. Pharm. Simona Alexandrova Alexandrova general educational and scientific degree "DOCTOR".

27. 02.2023

Sofia Assoc. prof. Dr. Maria Papazova, Ph.D