

С Т А Н О В И Щ Е

от доц. **Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова**, дб
член на научното жури, утвърдено със Заповед № 11/03.02.2023 г.
на Директора на Институт по невробиология, БАН

на дисертационния труд
на **Симона Александрова Александрова**
на тема

**„НЕВРОПРОТЕКТИВНИ МЕХАНИЗМИ В ЕФЕКТИТЕ НА ЕЛАГОВАТА КИСЕЛИНА ВЪРХУ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ПАРКИНСОНОВА БОЛЕСТ ПРИ ПЛЪХОВЕ“**

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
по научна специалност Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)
в професионално направление 7.1 Медицина,
област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт.
Научен ръководител на докторанта: проф. д-р Любка Танчева, дф

УВАЖАЕМИ ЧЛЕНОВЕ НА НАУЧНОТО ЖУРИ,

Настоящото становище е изготвено с оглед публичната защита пред научно жури на представения от докторантката Симона Александрова Александрова, дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия).

Представените документи и материали съответстват на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав в Институт по невробиология, БАН (ИНБ-БАН). Процедурата е спазена коректно.

Симона Александрова Александрова е родена на 15.05.1985 г. в гр. София. През 2008 г. завършва висшето си образование във Фармацевтичен факултет на Медицински университет – София и придобива професионална квалификация и правоспособност магистър фармацевт. Дванадесет години по-късно, през 2020 г., отново в Медицински университет – София, но към Факултета по обществено здраве придобива степен магистър по обществено здраве и здравен мениджмънт. Работи като медицински научен сътрудник и регионален мениджър клинични изпитвания във фармацевтичните компании Пфайзер и Новартис. Магистър фармацевт Симона Александрова е задочен докторант към направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“ в Институт по

невробиология, БАН и е отчислена с право на защита от Научния съвет на ИНБ-БАН с протокол №29/20.12.2022 г. Докторантката притежава много добри умения за работа с компютър и отлично владее английски език

Дисертационният труд на тема „*Невропротективни механизми в ефектите на елаговата киселина върху експериментален модел на Паркинсонова болест при плъхове*“ е написан на 156 страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Съдържание* – 3 стр., *Списък на използваните съкращения* – 2 стр., *Въведение* – 2 стр., *Литературен обзор* – 56 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материал и методи* – 13 стр., *Резултати* – 13 стр., *Обсъждане* – 12 стр., *Изводи* – 1 стр., *Справка за приносите* – 1 стр., *Списък на публикациите по темата на дисертацията* – 1 стр., *Списък на участията в научни форуми, свързани с дисертацията* – 2 стр., *Използвана Литература* – 47 стр., включваща 368 заглавия на латиница. Трудът е онагледен с 14 фигури и 5 таблици.

Темата на дисертационния труд е интересна и много добре подбрана. Тя е посветена на изследване на някои общи и специфични механизми на действие на естествения биоантиоксидант елагова киселина върху експериментален модел на Болест на Паркинсон, индуциран с невротоксина 6-OHDA върху плъхове. Елаговата киселина е полифенол, принадлежащ към групата на хидролизираните танини, и е липофилен антиоксидант, който инхибира липидната пероксидация дори в микромолярни количества. Елаготанините са естери на елаговата киселина с глюкоза или хининова киселина. Сред видовете съдържащи най-високи концентрации на елаготанини и елагова киселина са боровинките, червените боровинки, пеканът, малините, ягодите, орехите, гроздето, бадемите, зеления чай. Видовете с най-висок дял на свободна елагова киселина са сливата, какаду и нарът *Punica granatum*. Все повече експериментални изследвания показват, че екстракти от нар, богати на полифеноли, както и техните метаболити оказват влияние върху различните видове мозъчни клетки и поддържат техния редокс баланс, оцеляване и пролиферация, както и повлияват клетъчното сигнализиране. В резултат на неефективността на средствата, таргетиращи единични механизми, в последните години расте интересът към природните средства, които са известни със своята плурипотентност и безопасност. ЕК притежава силно изразен невропротективен ефект, благодарение на своя антиоксидантен капацитет, хелиращи свойства, способност за активиране на различни сигнални пътища, както и способност за повлияване на митохондриалната увреда.

Въведението е кратко, стегнато написано и въвежда читателя в предмета на дисертационния труд.

Литературният обзор е твърде подробен и дава в тематично обособени подраздели обширна информация за медицинската и социална значимост на Болестта на Паркинсон,

патогенезата, етиологията, клиничните прояви и съвременните фармакотерапевтични подходи за лечение на болестта на Паркинсон, както и търсенето на нови терапевтични възможности. От цитираните литературни източници 320 (87% от всички) са публикувани след 2000 година, което е доказателство за добрата литературна осведоменост на Дисертантката и актуалността на разработваната тематика. В литературния обзор са описани предишни данни на колектива за ефекти на елаговата киселина при експериментални модели на болест на Алцхаймер и оксидативен стрес.

Целта на изследването е ясно и точно дефинирана. **Задачите** са правилно формулирани и, както ще се разбере от последващото изложение, са напълно изпълними с помощта на използваните методи. Целта на разработвания дисертационен труд е изследване на невропротективните ефекти на елаговата киселина върху експериментален модел на Болест на Паркинсон предизвикан с унилатерално приложение на 6-хидроксидопамин (6-OHDA) при лабораторни плъхове. За постигането на тази цел докторантката си е поставила за изпълнение 5 конкретни задачи.

Разделът **Материал и методи** е сравнително кратък, но изчерпателен. Спазени са необходимите етични изисквания при работа с животни като броят на взетите проби е сведен до необходимия минимум за постигане на статистически достоверни резултати. Използван е модел на болест на Паркинсон чрез интрастриатално въвеждане на невротоксина 6-OHDA с помощта на стереотаксична техника. Поради слабата разтворимост на елаговата киселина във вода, веществото е включено в емулсия за интраперитонеално приложение, като използваният емулгатор е Tween 80. За изпълнение на поставените задачи са използвани поведенчески методи (тест с апоморфин - предизвикани ротации за оценка на унилатерална нигростриатална загуба на допаминергични неврони; Rotarod тест - метод за определяне степента и динамиката на моторната координация; тест за пасивно избягване за изследване на обучението и паметта). Изследвани са биохимични параметри на антиоксидантната активност в тъканен хомогенат като липидна пероксидация, нива на тотален редуциран глутатион, активност на супероксиддисмутаза, активност на глутатион пероксидаза, Активност на каталаза по метода на Aebi, определяне на протеиново съдържание по метода на Lowry и колектив от 1951 г., неврохимичен метод за определяне на нивата на допамин в мозъчна тъкан.

Разделът **Резултати** е разделен на отделни, описателно формулирани подраздели, и развит в последователност, следваща хронологично поставените задачи. Установено е, че елаговата киселина притежава невропротективни ефекти върху плъхове с модел на унилатерална 6-OHDA индуцирана Болест на Паркинсон. Мощното антиоксидантно действие на елаговата киселина, води до стимулиране на естествената антиоксидантната защита и до понижаване на оксидативния стрес в мозъка. Способността на елаговата

киселина да увеличава допаминовите нива в мозъка, води до забавяне прогресията на Болестта на Паркинсон. Забележителна е селективната способност на елаговата киселина да повлиява предимно увредената хемисфера, където нивата на оксидативния стрес са чувствително по-високи от тези на интактната хемисфера. Установена е значителна промяна в допаминовите нива ипсилатерално при животни претретиран с елагова киселина.

Дискусията, е много добре написана и показва уменията на докторантката за обсъждане на собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в литературата, и интерпретирайки ги умело да направи ценни изводи за ефектите на елаговата киселина.

Изводите, до които достига докторантката са 5 и са логична последователност от задълбочения и адекватен анализ на получените резултати. Формулираните **приноси** са 5 и са предимно с научен характер.

Авторефератът на дисертационния труд е изготвен съгласно изискванията и адекватно отразява състоянието на изследвания проблем, поставените цел и задачи, използваните методи за тяхната практическа реализация, получените резултати, тяхното аналитично описание и интерпретиране на собствените данни, както и направените авторски изводи и приноси.

Настоящият дисертационен труд е дело на Симона Александрова Александрова, като доказателство за тази констатация са представените от нея научни публикации и съобщения по темата. Докторантката представя списък с четири публикации по темата на дисертацията, като три от публикациите са с импакт фактор, а в две от тях тя е първи автор. Резултатите от изследванията са широко популяризирани и докладвани на общо 12 научни форуми, като 9 от форумите са в България, а три от тях в чужбина (Малатиа, Турция; Лондон, Великобритания и Виена, Австрия).

В **заключение** считам, че дисертационният труд на Симона Александрова Александрова е едно задълбочено и комплексно изследване на невропротективните механизми на елаговата киселина върху експериментален модел на болест на Паркинсон при плъхове. То е добре замислено и прецизно методично обосновано, акуратно изпълнено и илюстрирано. Получените данни са ясно дискутирани и допринасят за разширяване на наличното познание за невропротективното действие на елаговата киселина върху унилатерален 6-OHDA модел на Болест на Паркинсон при нейното превантивно приложение. Визуализирана е оригинална пряка корелация между възстановяването на допаминергичната система, антиоксидантния ефект и подобряването на нервномускулната координация при плъхове, вследствие прилагане на елагова киселина. Резултатите от изследването внасят оригинален и значим теоретично-приложен принос за способността на елаговата киселина да повлиява селективно увредената хемисфера, в сравнение с

интактната. Представеният труд отговаря на законовите изискванията за придобиване на научно-образователната степен. Въз основа на всичко гореизложено, убедено изказвам **положително** мнение за разработения дисертационен труд и в качеството ми на член на Научното жури по процедурата давам своя положителен вот за присъждане на образователната и научна степен “*Доктор*” на Симона Александрова Александрова.

Изготвил становището,

Доц. д-р Димитринка Атанасова-Димитрова

27.02.2023г.

София

S T A T E M E N T

by **Assoc. Prof. Dimitrinka Yordanova Atanasova-Dimitrova, PhD,**

Member of the scientific jury, approved by Order No. 11/03.02.2023

Of the Director of the Institute of Neurobiology, BAS

of the dissertation work

of **Simona Alexandrova Alexandrova**

on topic

“NEUROPROTECTIVE MECHANISMS IN THE EFFECTS OF ELLAGIC ACID ON AN EXPERIMENTAL RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE”

For awarding the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy"

In the scientific specialty Pharmacology (including pharmacokinetics and chemotherapy)

In professional direction 7.1 Medicine,

Area of higher education 7. Health care and sports.

Scientific supervisor of the doctoral student: Prof. Lyubka Tancheva, PhD

DEAR MEMBERS OF THE SCIENTIFIC JURY,

This statement was prepared for public defense of the dissertation work presented by the doctoral student Simona Alexandrova Alexandrova for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" in the scientific specialty Pharmacology (including pharmacokinetics and chemotherapy).

The presented documents and materials correspond to the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Rules for its Implementation and the Rules for the Development of the Academic Staff at the Institute of Neurobiology, BAS. The procedure has been correctly followed.

Simona Alexandrova Alexandrova was born on 15.05.1985 in the city of Sofia. In 2008, she completed her higher education at the Faculty of Pharmacy of the Medical University - Sofia and acquired a professional qualification and legal capacity as a Master of Pharmacy. Twelve years later, in 2020, again at the Medical University - Sofia, but at the Faculty of Public Health, she obtained a master's degree in Public health and health management. She is a medical Research Associate and regional manager of clinical trials at the Pfizer and Novartis pharmaceutical companies. Simona Alexandrova Alexandrova is a part-time doctoral student at the Department of Biological Effects of Natural and Synthetic Substances at the Institute of Neurobiology, BAS and has been addressed with the right of defense by the Scientific Council of

the Institute of Neurobiology, BAS, with protocol No. 29/20.12.2022. The doctoral student has excellent computer skills and excellent command of the English language.

The dissertation work on "*Neuroprotective mechanisms in the effects of ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease in rats*" is written in 156 pages and divided into sections as follows: *Content* – 3 pages, *List of used abbreviations* – 2 pages, *Introduction* – 2 pages, *Literature review* – 56 pages, *Aim and objectives* – 1 page, *Material and methods* – 13 pages, *Results* – 13 pages, *Discussion* – 12 pages, *Conclusions* – 1 page, *Reference to contributions* – 1 page, *List of publications on the topic of the dissertation* – 1 page, *List of participations in scientific forums related to the dissertation* – 2 pages, *References* – 47 pages, including 368 titles in Latin. The work is illustrated with 14 figures and five tables.

The topic of the dissertation is interesting and very well chosen. It is dedicated to the study of some general and specific mechanisms of action of the natural antioxidant ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease induced with the neurotoxin 6-OHDA in rats. Ellagic acid is a polyphenol belonging to the group of hydrolyzed tannins and is a lipophilic antioxidant that inhibits lipid peroxidation even in micromolar amounts. Ellagitannins are esters of ellagic acid with glucose or quinic acid. Among the species containing the highest concentrations of ellagitannins and ellagic acid are blueberries, cranberries, pecans, raspberries, strawberries, walnuts, grapes, almonds, and green tea. The species with the highest proportion of free ellagic acid are the Kakadu plum and the pomegranate *Punica granatum*. More and more experimental studies show that pomegranate extracts, rich in polyphenols as well as their metabolites, influence different types of brain cells and support their redox balance, survival and proliferation, as well as influence cell signalling. As a result of the ineffectiveness of means targeting single mechanisms, in recent years, there has been a growing interest in natural means known for their pluripotency and safety. Ellagic acid has a highly pronounced neuroprotective effect thanks to its antioxidant capacity, chelating properties, ability to activate various signalling pathways, as well as the ability to affect mitochondrial damage.

The **Introduction** is short, concisely written and introduces the reader to the subject of the dissertation.

The **Literature review** is very detailed and provides, in thematically separated subsections, extensive information about the medical and social significance of Parkinson's disease, its pathogenesis, aetiology, clinical manifestations and modern pharmacotherapeutic approaches for the treatment of Parkinson's disease, as well as the search for new therapeutic options. Of the cited literary sources, 320 (87% of all) were published after the year 2000, which is proof of the Dissertation's good literary awareness and the relevance of the developed topic.

The literature review describes the team's previous data on the effects of ellagic acid in experimental models of Alzheimer's disease and oxidative stress.

The **purpose** of the research is clearly and precisely defined. The **tasks** are correctly formulated and, as will be understood from the subsequent exposition, are utterly feasible with the help of the methods used. The developed thesis aims to study the neuroprotective effects of Ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease induced by unilateral administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in laboratory rats. To achieve this goal, the doctoral student has set herself five specific tasks.

The **Material and Methods** section is relatively short but comprehensive. The necessary ethical requirements for working with animals were observed, and the number of samples taken was reduced to the minimum required to achieve statistically reliable results. A model of Parkinson's disease was used by intrastriatal administration of the neurotoxin 6-OHDA using a stereotaxic technique. Due to the low solubility of ellagic acid in the water, the substance was included in an emulsion for intraperitoneal administration, and the emulsifier used was Tween 80. Behavioral methods were used to perform the tasks (apomorphine test - induced rotations to assess unilateral nigrostriatal loss of dopaminergic neurons; Rotarod test - a method for determining the degree and dynamics of motor coordination; passive avoidance test for studying learning and memory). Biochemical parameters of antioxidant activity in tissue homogenate such as lipid peroxidation, total reduced glutathione levels, superoxide dismutase activity, glutathione peroxidase activity, catalase activity by Aebi's method, determination of protein content by Lowry's method were investigated, a neurochemical method for determining dopamine levels in brain tissue.

The **Results** section is divided into separate, descriptively formulated subsections and developed in a sequence following the chronologically set tasks. Ellagic acid was found to have neuroprotective effects in a rat model of unilateral 6-OHDA-induced Parkinson's disease. The powerful antioxidant effect of ellagic acid leads to the stimulation of the natural antioxidant defense and to the reduction of oxidative stress in the brain. Ellagic acid's ability to increase dopamine levels in the brain slows the progression of Parkinson's disease. Remarkable is the selective ability of ellagic acid to preferentially affect the damaged hemisphere, where levels of oxidative stress are significantly higher than those of the intact hemisphere. A significant change in ipsilateral dopamine levels was found in animals pretreated with ellagic acid.

The **Discussion** is very well written and shows the PhD student's ability to discuss her own results, compare them with known facts in the literature, and interpret them skillfully to draw valuable conclusions about the effects of ellagic acid.

The **Conclusions** reached by the doctoral student are five and are a logical sequence of the in-depth and adequate analysis of the obtained results. The formulated **contributions** are five, and they are mainly of scientific nature.

The **Abstract of the dissertation** is prepared according to the requirements and adequately reflects the state of the researched problem, the set goals and objectives, the methods used for their practical implementation, the results obtained, their analytical description and interpretation of the own data, as well as the author's conclusions and contributions.

The present dissertation work is the work of Simona Alexandrova Alexandrova; as proof of this finding is the scientific publications and reports presented by her on the subject. The doctoral student presents a list of four publications on the topic of the dissertation, three of which have an impact factor and two of which she is the first author. The research results have been widely popularized and reported on a total of 12 scientific forums, 9 of which are in Bulgaria and three of them abroad (Malatia, Turkey; London, Great Britain and Vienna, Austria).

In **Conclusion**, I believe that the dissertation work of Simona Alexandrova Alexandrova is an in-depth and complex study of the neuroprotective mechanisms of ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease in rats. It is well thought out and precisely methodically grounded, accurately executed and illustrated. The obtained data are clearly discussed and contribute to expanding the available knowledge about the neuroprotective effect of ellagic acid on a unilateral 6-OHDA model of Parkinson's disease in its preventive application. An original direct correlation was visualized between the restoration of the dopaminergic system, the antioxidant effect and the improvement of neuromuscular coordination in rats following the administration of ellagic acid. The results of the study make an original and significant theoretical-applied contribution to the ability of ellagic acid to selectively affect the damaged hemisphere, compared to the intact one. The presented work meets the legal requirements for obtaining the scientific and educational degree. Based on all of the above, I confidently express a **positive opinion** about the developed dissertation work and, in my capacity as a member of the Scientific Jury, I give my positive vote for awarding the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" to Simona Alexandrova Alexandrova.

Prepared the statement,

Assoc. Prof. Dimitrinka Atanasova-Dimitrova, PhD

27.02.2023

Sofia