

## СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Румен Павлов Николов, дм  
Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София

**Член на научно жури (заповед на Директора на ИНБ - БАН № 11/03.02.2023 г. във връзка с процедура за защита на дисертационен труд на тема „НЕВРОПРОТЕКТИВНИ МЕХАНИЗМИ В ЕФЕКТИТЕ НА ЕЛАГОВАТА КИСЕЛИНА ВЪРХУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ПАРКИНСОНОВА БОЛЕСТ ПРИ ПЛЪХОВЕ“ на Симона Александрова Александрова-Митева, задочен докторант към направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“ в Института по невробиология при БАН в докторска програма по фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия), професионално направление „7.1. Медицина“ и област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт“. Научен ръководител на докторанта: проф. д-р Любка Танчева, д.ф.**

Всички документи в съответствие с изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИНБ – БАН ми бяха предоставени.

Докторантката Симона Александрова-Митева е положила успешно необходимите изпити: докторантски минимум (фармакология) и чужд език.

### **Биографични данни**

Маг. фар. Симона Александрова- Митева е родена на 15.05. 1985 г. в гр. София. Придобива степен магистър по фармация при Фармацевтичен факултет на Медицински университет – София през 2008 г. През 2020 г. придобива степен магистър по обществено здраве и здравен мениджмънт във Факултета по обществено здраве при Медицински университет - София. Работи като медицински научен сътрудник и регионален мениджър клинични изпитвания във фармацевтичните компании Новартис и Пфайзер.

Докторантката Симона Александрова-Митева владее писмено и говоримо английски език. Притежава много добри умения за работа с компютър с основните офис програми.

## **Преценка на представения дисертационен труд**

### **Структура на дисертационния труд**

Представеният ми дисертационен труд съдържа 156 страници и е онагледен с 14 фигури и 5 таблици. Цитирани са 368 литературни източника на латински език.

Научният труд е правилно структуриран в следните раздели: въведение – 2 стр., литературен обзор – 53 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 12 стр., резултати – 13 стр., обсъждане – 12 стр., изводи – 1 стр., приноси – 1 стр., списък на публикациите по темата на дисертацията – 1 стр., списък на участията в научни форуми, свързани с дисертацията – 2 стр. и библиография – 47 стр.

### **Актуалност на темата на дисертацията**

Дисертационният труд е написан задълбочено, компетентно и изчерпателно. Темата на дисертационния труд е посветена на актуален проблем, свързан с изследване на невропротективните механизми в ефектите на елагова киселина върху експериментален модел на Паркинсонова болест. През последните 10 години се търсят нови по-безопасни терапевтични възможности за повлияване на когнитивните нарушения и ограничаване на основните болестни процеси при пациенти с невродегенеративни заболявания.

Елаговата киселина е мощен естествен антиоксидант, който се съдържа в различни плодове, ядки и растения. Представлява полифенолно съединение, което се открива в свободна форма или свързана с полиоли или захари, съставляващи хидролизируеми танини или елагитанини. *In vitro* и *in vivo* експериментални проучвания показват, че елаговата киселина проявява протективно действие върху мозъчната функция, противовъзпалителна активност и антипролиферативен ефект върху туморни клетки. В литературата се демонстрират данни за антихиперлипидемичен, хепатопротективен и антибактериален ефект на елаговата киселина. Освен това екстракт от елагова киселина редуцира хиперпигментирането на кожата, поради което се включва в хранителни добавки и продукти за грижа за кожата.

Елагова киселина се съдържа в много видове плодове и ядки. Някои от най-богатите хранителни източници на елагова киселина са нар, ябълки, грозде, ягоди, малини,

боровинки, орехи, шам-фъстък, кашу и др. Напр. плодовият екстракт от нар обикновено съдържа 250-500 mg елагова киселина.

### **Литературен обзор**

Литературният обзор е написан компетентно и включва съвременни източници, свързани с темата на настоящия дисертационен труд. В литературния обзор са подробно представени медицинската и социалната значимост на Паркинсовата болест, етиологията, патогенезата, клиничната картина и актуалните фармакотерапевтични подходи на Паркинсоновата болест, както и новите насоки в търсенето на нови терапевтични възможности за фармакологично повлияване на болестта на Паркинсон. В отделна част на обзора са разгледани фармакологичните ефекти на елаговата киселина и основните механизми на нейното протективно действие при невродегенеративни заболявания. В литературния обзор са описани предишни данни на колектива за ефекти на елаговата киселина при експериментални модели на оксидативен стрес и Алцхаймерова болест.

Литературната справка показва, че докторантката е запознат задълбочено с проблемите, свързани с дисертационния труд, вкл. най-новите проучвания в тази насока.

### **Цел и задачи на проучването**

Целта на проучването е точно и ясно формулирана. Задачите за нейното изпълнение са добре определени, конкретни и съответстват на поставената цел.

Цел на настоящия дисертационен труд е да се изследват невропротективните ефекти на елагова киселина върху експериментален модел на болест на Паркинсон, предизвикан с унилатерално приложение на 6- хидроксидопамин на плъхове.

За постигането на тази цел маг. фарм. Симона Александрова-Митева си е поставила за изпълнение 5 задачи, които са добре формулирани и конкретизирани в съответствие с целта на дисертационния труд.

### **Материали и методи**

Експериментите са проведени върху мъжки плъхове от порода Wistar. За целите на проучването е използван модел на Паркинсонова болест, предизвикан чрез директно инжектиране на 6- хидроксидопамин в мозъка на опитните животни чрез стереотаксична

техника. Ефектите на елаговата киселина са изследвани чрез интраперитонеалното ѝ въвеждане под формата на стабилна емулсия в обем 1 ml.

В проучването са използвани поведенчески методи (метод за определяне на степента на унилатералните лезии метод за определяне на двигателната координация, метод за изследване на обучението и паметта – тест за пасивно избягване с отрицателно подкрепление) и биохимични методи (метод за определяне на нивата на допамин в мозъчна тъкан, липидна пероксидация, определяне съдържанието на протеини по метода на Lowry et al. и определяне нивата на тотален редуциран глутатион и активността на супероксиддисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза).

За обработка на резултатите са използвани подходящи статистически методи.

Методичният подход е съвременен и достатъчен за изпълнение на поставените цел и задачи.

## **Резултати**

Получените резултати са много подробно онагледени и компетентно анализирани.

Установен е невропротективен ефект на елаговата киселина при експериментален модел на болест на Паркинсон, предизвикан с унилатерално приложение на 6-хидроксидопамин на плъхове. Елаговата киселина има значим невропротективен ефект при плъхове, третирани с невротоксин и забавят прогресирането на Паркинсонова болест при експерименталните животни.

При прилагане на елагова киселина е установено повишаване на нивата на допамин в мозъка и намаляване на липидната пероксидация в увредените области; промените на оксидативния стрес са свързани с поведенческите параметри на плъховете; нивата на допамин показват пряка връзка с поведенческото представяне на животните.

Получените резултати показват селективната способност на елаговата киселина да повлиява предимно увредената хемисфера, където нивата на оксидативния стрес са чувствително по-високи от тези на интактната хемисфера.

## **Изводи и научни приноси**

Основните изводи, до които достига докторантката са 5 и представляват логична последователност на задълбочения и компетентен анализ на получените резултати.

Формулираните приноси в дисертационният труд са 5. Приносите имат предимно научен характер, като за първи път за първи път е установено невропротективното действие на елагова киселина върху унилатерален модел на болестта на Паркинсон, индуциран чрез прилагана на 6- хидроксидопамин. Установеното невропротективно действие на елагова киселина има потенциално значение за клиничната практика като нова възможност за фармакологичното повлияване на невродегенеративни заболявания.

### **Наукометрични показатели, свързани с дисертационния труд**

Във връзка с дисертационния си труд маг. фарм. Симона Александрова-Митева е представила списък с 4 публикации, като 3 от тях са в списания с IF. В 2 от представените публикации тя е първи автор.

Докторантката е представила списък с 12 участия в конгреси и конференции.

### **Автореферат**

Авторефератът на дисертационния труд съдържа 48 страници, 7 фигури и 1 таблица. Приложеният автореферат отразява адекватно основното съдържание на дисертацията и получените резултати.

**Препоръки и критични забележки:** Препоръчвам на докторантката да продължи публикационната си активност.

### **Заключение**

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИНБ – БАН.

Считам, че представеният дисертационен труд е добре оформен, като в него са използвани фармакологични и биохимични експериментални методи, получените резултати са обработени и представени отлично и потвърждават поставените цел и задачи.

Въз основа на подробно изложените положителни страни на представения ми дисертационен труд, убедено препоръчвам на уважаемите членове на научното жури да гласуват **положително** за присъждане на образователната и научна степен “Доктор“ в докторска програма по фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия) на маг. фарм. Симона Александрова Александрова-Митева.

09.02.2023 г.

Изготвил становището:

/Проф. д-р Румен Николов, дм/

**OPINION**

by Prof. Rumen Nikolov, MD, PhD

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine,  
Medical University of Sofia

**Member of the scientific jury (order of the Director of the Institute of Neurobiology - BAS No. 11/03.02.2023 in connection with the procedure for the defense of a dissertation work on the topic "NEUROPROTECTIVE MECHANISMS IN THE EFFECTS OF ELLAGIC ACID ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE IN RATS" by Simona Alexandrova Alexandrova-Miteva, part-time doctoral student at the "Biological effects of natural and synthetic substances" department at the Institute of Neurobiology at the BAS in the doctoral program in pharmacology (incl. pharmacokinetics and chemotherapy), professional department "7.1. Medicine" and field of higher education 7. Health and sport". Scientific supervisor of the doctoral student: Prof. Dr. Lyubka Tancheva, PhD.**

All documents in accordance with the requirements of the Regulations for the terms and conditions for acquiring scientific degrees and holding academic positions at the Institute of National Statistics - BAS were provided to me.

Doctoral student Simona Alexandrova-Miteva has successfully passed the required exams: doctoral minimum (pharmacology) and foreign language.

**Biographical data**

Simona Alexandrova-Miteva, Master of Pharmacy was born on 15.05. 1985 in the city of Sofia. He obtained a master's degree in pharmacy at the Faculty of Pharmacy of the Medical University - Sofia in 2008. In 2020 she obtained a master's degree in public health and health management at the Faculty of Public Health at the Medical University - Sofia. She works as a medical research associate and regional manager of clinical trials at the pharmaceutical companies Novartis and Pfizer.

Doctoral student Simona Alexandrova-Miteva is fluent in written and spoken English. Has very good computer skills with basic office programs.

## **Assessment of the submitted dissertation work**

### **Structure of the dissertation**

The presented dissertation contains 156 pages and is illustrated with 14 figures and 5 tables. 368 literary sources in Latin are cited.

The scientific work is properly structured in the following sections: introduction – 2 pages, literature review – 53 pages, aim and tasks – 1 page, materials and methods – 12 pages, results – 13 pages, discussion – 12 pages, conclusions - 1 page, 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 and bibliography - 47 pages.

### **Relevance of the dissertation topic**

The dissertation is written thoroughly, competently, and comprehensively. The topic of the dissertation is dedicated to a current problem related to the study of neuroprotective mechanisms in the effects of ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease. In the last 10 years, new safer therapeutic options have been sought to affect cognitive disorders and limit the underlying disease processes in patients with neurodegenerative diseases.

Ellagic acid is a powerful natural antioxidant found in various fruits, nuts, and plants. It is a polyphenolic compound that is found in free form or associated with polyols or sugars constituting hydrolysable tannins or ellagitannins. In vitro and in vivo experimental studies show that ellagic acid exhibits a protective effect on brain function, anti-inflammatory activity, and an anti-proliferative effect on tumor cells. The literature demonstrates evidence of antihyperlipidemic, hepatoprotective and antibacterial effects of ellagic acid. In addition, ellagic acid extract reduces skin hyperpigmentation, which is why it is included in nutritional supplements and skin care products.

Ellagic acid is found in many types of fruits and nuts. Some of the richest food sources of ellagic acid are pomegranate, apples, grapes, strawberries, raspberries, blueberries, walnuts, pistachios, cashews, etc. E.g., pomegranate fruit extract usually contains 250-500 mg of ellagic acid.

### **Literature review**

The literature review is competently written and includes contemporary sources related to the topic of this dissertation. The literature review presents in detail the medical and social significance of Parkinson's disease, the etiology, pathogenesis, clinical picture and current



pharmacotherapeutic approaches of Parkinson's disease, as well as the new directions in the search for new therapeutic possibilities for pharmacologically influencing Parkinson's disease. In a separate part of the review, the pharmacological effects of ellagic acid and the main mechanisms of its protective action in neurodegenerative diseases are discussed. A literature review describes the team's previous data on effects of ellagic acid in experimental models of oxidative stress and Alzheimer's disease.

The literature review shows that the doctoral student knows in depth the problems related to the dissertation work, incl. the latest research in this direction.

### **Purpose and tasks of the study**

The purpose of the study is precisely and clearly formulated. The tasks for its implementation are well defined, specific and correspond to the set goal.

The aim of the present dissertation is to investigate the neuroprotective effects of ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease induced by unilateral administration of 6-hydroxydopamine in rats.

To achieve this goal Simona Alexandrova-Miteva, Master of Pharmacy has set herself 5 tasks, which are well formulated and specified in accordance with the purpose of the dissertation work.

### **Materials and methods**

The experiments were carried out on male Wistar rats. For the purposes of the study, a model of Parkinson's disease was used, induced by direct injection of 6-hydroxydopamine into the brain of experimental animals using a stereotaxic technique. The effects of ellagic acid were studied by its intraperitoneal administration in the form of a stable emulsion in a volume of 1 ml.

The study used behavioral methods (a method for determining the degree of unilateral lesions, a method for determining motor coordination, a method for studying learning and memory - a passive avoidance test with negative reinforcement), and biochemical methods (a method for determining dopamine levels in brain tissue, lipid peroxidation, determination of protein content by the method of Lowry et al., and determination of total reduced glutathione levels and the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase).

Appropriate software programs were used to process the survey results.

The methodical approach is modern and sufficient to fulfill the set goals and tasks.

## **Results**

The obtained results are very detailed and competently analyzed.

A neuroprotective effect of ellagic acid was established in an experimental model of Parkinson's disease induced by unilateral administration of 6-hydroxydopamine in rats. Ellagic acid has a significant neuroprotective effect in rats treated with a neurotoxin and slows down the progression of Parkinson's disease in experimental animals.

When applying ellagic acid, an increase in dopamine levels in the brain and a decrease in lipid peroxidation in the damaged areas were found; changes in oxidative stress are associated with behavioral parameters of rats; dopamine levels show a direct correlation with the animals' behavioral performance.

The obtained results show the selective ability of ellagic acid to affect primarily the damaged hemisphere, where the levels of oxidative stress are significantly higher than those of the intact hemisphere.

## **Conclusions and scientific contributions**

The main conclusions reached by the doctoral student are 5 and represent a logical sequence of the in-depth and competent analysis of the obtained results.

The formulated contributions in the dissertation work are 5. The contributions are mainly of a scientific nature, and for the first time, the neuroprotective effect of ellagic acid on a unilateral model of Parkinson's disease induced by the administration of 6-hydroxydopamine was established for the first time. The established neuroprotective effect of ellagic acid has potential importance for clinical practice as a new possibility for the pharmacological influence of neurodegenerative diseases.

## **Scientometric indicators related to the dissertation work**

In connection with his dissertation Simona Alexandrova-Miteva, Master of Pharmacy has submitted a list of 4 publications, 3 of which are in IF journals. In 2 of the presented publications, she is the first author.

The doctoral student presented a list of 12 participations in congresses and conferences.

## **Doctoral Thesis**

The doctoral thesis contains 48 pages, 7 figures and 1 table. The attached abstract adequately reflects the main content of the dissertation and the results obtained.

**Recommendations and critical remarks:** I recommend the doctoral student to continue her publication activity.

### **Conclusion**

The dissertation contains scientific, scientific-applied and applied results, which represent an original contribution to science and meet all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ZRASRB) and the Regulations on the Terms and Conditions for Acquiring Scientific Degrees and Holding academic positions at the Institute of Neurobiology - BAS.

I believe that the presented dissertation work is well-formed, as it uses pharmacological and biochemical experimental methods, the obtained results are processed and presented excellently and confirm the set goals and tasks.

Based on the detailed positive aspects of my presented dissertation, I strongly recommend to the respected members of the scientific jury to vote positively for awarding the educational and scientific degree "Doctor" in the doctoral program in pharmacology (incl. pharmacokinetics and chemotherapy) to Simona Alexandrova Alexandrova-Miteva, Master of Pharmacy.

February 09, 2023

Prepared the opinion: .....

Prof. Dr. Rumen Nikolov, PhD