

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. Христо Стефанов Гагов, д-р,
Биологически факултет,
СУ „Св. Климент Охридски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен '**доктор**',
професионално направление **4.3. Биологически науки**, докторска програма
“Физиология на животните и човека - Поведенческа невробиология”, ИНБ-БАН

Автор: ас. Десислава Здравкова Крушовлиева

Форма на докторантурата: редовна подготовка

Тема: ПРОУЧВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА МЕЛАТОНИНОВИЯ ДЕФИЦИТ ВЪРХУ НЯКОИ
МЕХАНИЗМИ НА СТАРЕЕНЕ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ПИНЕАЛЕКТОМИЯ

Научен ръководител: проф. д-р Яна Димитрова Чекаларова – ИНБ-БАН

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представени са комплект материали, включващи следните документи:

- Заявление до Директора на Института по невробиология - БАН (ИНБ-БАН) за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- автобиография в европейски формат с подпис на докторанта
- копие от диплома за висше образование за Молекулярен биолог (магистър по Физиология на животните и човека)
- протокол от научен семинар за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на научните публикации
- списък на участията в научни форуми

- справка за изпълнение на минималните изисквания по чл. 9, ал2 от ЗРАСРБ и приетите от НС на ИНБ минимални изисквания за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИНБ
- други документи, свързани с хода на процедурата.

Докторантката е приложила 2 публикации в списания с импакт фактор (ИФ).

Приложени са всички необходими документи.

Ас. Десислава Здравкова Крушовлиева е възпитаник на Софийския университет „Св. Климент Охридски“, където през 2021 г. придобива ОС „магистър“ по „Молекулярна биология“, завършвайки успешно магистърска програма „Физиология на животните и човека“. От 2021 г. – досега работи и се обучава по специалността „Физиология на животните и човека“ в ИНБ-БАН.

2. Актуалност на тематиката

Разработваните в дисертационния труд задачи са изключително актуални, предвид сложните процеси на стареене и на различни ендокринни дисфункции. Застаряващото население в световен мащаб и особено в технологично по-развитите страни изостря вниманието на изследователите върху напредващата с възрастта деградация на органите и системите. Във връзка с настъпващата с остаряването драматична деградация на нервната система се откроява акцентът върху изследванията на ЦНС и механизмите нейните дисфункции, както и влиянието на най-различни фактори върху последствията на различни невродегенеративни процеси и патологии като болестта на Алцхаймер и болестта на Паркинсон. Успешното забавяне на възрастовите промени, освен че ще подобри качеството на живот в този период на онтогенезата на човека, би позволило и удължаване на периода на трудова активност, като и двата ефекта биха имали голяма социална значимост.

Настоящият дисертационен труд е фокусиран върху ролята на дефицита на мелатонин в резултат на отстраняването на епифизата върху продължителността на живот и някои функции на ЦНС при плъх с цел изясняване ролята на този хормон с ясно изразена циркадна динамика в процесите на стареене. По този начин дисертацията внася своя принос за изясняването и в някаква степен за решаването на някои аспекти от споменатите по-горе глобални проблеми.

3. Познаване на проблема

Цитираните 386 литературни източника (от тях 66 от 2020 г. досега, което е около 17%), както и подробният Литературен обзор, простиращ се на общо 38 страници, не оставят съмнение, че докторантката добре познава състоянието на проблема и в необходимата дъл-

бочина използва научната литература. Литературният обзор разглежда задълбочено много теми. Поради това бих го характеризирал като амбициозен.

4. Методи на изследването

Избрани са поведенчески тестове за многостранно изследване на постигнатия чрез пинеалектомия модел на дефицит на мелатонин при плъх, които са насочени към определяне на двигателната активност, тревожността, работната и пространствената памет, и разпознаването на обекти от животни на различна възраст (3, 14 и 18 месеца). Освен тези тестове са използвани методите ELISA анализ на хомогенати от хипокамп за топлинно-шоковите протеини HSP70 и HSP90, и на транскрипционния фактор CREB, както и имунохистохимичен анализ на мозъчни структури за невротрофина BDNF и тропомиозиновата рецепторна киназа B (TrkB). Използваната статистическа обработка е адекватна на целите на изследването.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд, изводите и приносите

В тази дисертация разделите Резултати и Обсъждане са отделни, което е дало възможност за задълбочена дискусия на получените резултати, вместо срещаните понякога кратки коментари на получените резултати при сливане на тези два раздела. Разделът Резултати съдържа 34 страници, 20 фигури и 2 таблици. Повечето от фигурите съдържат няколко панела, които при хистохимичните изследвания те често са над 10. Без съмнение този труд представя множество данни като някои от изследванията с едни и същи опитни животни са продължили повече от година. Разделът Обсъждане е на 11 страници и са обсъдени подробно всички получени резултати.

Изводите добре обобщават получените данни за влиянието от премахването на епифизата и получения в резултат на това дефицит на мелатонин върху продължителността на живота на плъховете (т.е. отбелязана е липсата на такъв), за ефекта от пинеалектомията върху функционални показатели като тревожност, импулсивен тип поведение, краткосрочна пространствена памет, както и някои протеини на топлинния стрес и маркери на стареене, свързани с когнитивни функции. Установено е, че с възрастта намалява ролята на мелатониновия дефицит като фактор на стареене върху ЦНС при плъх.

Приносите са пет и са добре подкрепени от данните в дисертацията. Приемам направените изводи и приноси.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Научните публикации, съдържащи резултати от дисертацията, са две. Те са на английски език в списания с импакт фактор като едната от тях е в списанието „Behavioral and Brain Functions“ (2024), което е с висок ранг (Q1, 25 т.), а другата е публикувана в „Acta Morphologica et Anthropologica“ през 2022 г. Втората публикация носи 10 т. Така се набират

35 т. при необходими поне 30 т. В едната кандидатката по този конкурс е първи автор, а в другата - втори. Тези статии не са цитирани в Scopus, което бе проверено на 05.09.2025 г. Освен тях ас. Десислава Крушовлиева е съавтор в четири други публикации в Scopus със сходна тематика, цитирани там общо 18 пъти (проверено на 05.09.2025 г.), което свидетелства за интензивен изследователски опит на докторантката (предвид че са за периода от 2023 г. - досега) върху ефектите на мелатонина, ангиотензиновия 1 рецептор и др. върху функции на ЦНС и за интереса ѝ към тези изследвания. За отбелязване е възходящата тенденция при цитиранията: 6 за 2024 и 12 за 2025. Очаквам в скоро време да се цитира поне една от публикациите по този конкурс. Отбелязани са и 5 участия с доклади в конференции по темата на дисертацията като във всички тях ас. Десислава Крушовлиева е първи автор.

7. Впечатления от докторантката

Познавам ас. Десислава Крушовлиева от времето, когато беше магистър към катедрата по „Физиология на животните и човека“ към Биологически факултет. Тогава ми направи впечатление на мотивирана студентка с интерес към биологичното познание и желание за научна работа. По водения от мен задължителен курс „Физиология на възбудимите клетки“ е получила отлична оценка.

Критични забележки. Нямам забележки по същество, но забелязвам някои технически пропуски. На стр. 15, предпоследен параграф, не е ясно коя от 4-те цитирани по-долу статии подкрепя твърдението, че „Нивата на мелатонин могат да се повлияят от вещества като кофеин и орални контрацептиви...“; в такива случаи е добре да се посочва и как се повлиява (напр. увеличава, намалява); в т. 1.4., първи параграф, цитатите са дадени накуп накрая, а не след всяко твърдение; някои цитирания на двама автори са дадени като A1 и A2 (A1 & A2, година), в такива случаи в скобите е достатъчно да има само годината; на стр. 40, ред 9 е написано „и т.н.“ вместо „и т. нар.“. В Списъка на съкращенията липсват ROR, REV-ERB, TRX-1, ХОББ и Cry1/2, като последното е доста различно от въведеното съкращение Cry; електронно-транспортна верига е съкратена ЕТК, което е съкращение за електронно-транспортна кинетика; на стр. 27, 4 параграф, съкращението UTMD е за Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction, а не на посоченото в текста Utah Medical Products; болестта на Алцхаймер е съкратена по два начина - като AD и БА, като едното е излишно. В текста има много съкращения, което понякога затруднява четенето. Някои са употребени само веднъж като липополизахариди (LPS) или фосфатен буфер (PB) и затова може да се махнат.

Номерирането само на нечетните страници считам за неудачно. Последното изречение в раздела Обсъждане няма връзка с предходното и би било добре да се замени с друго, което по подобаващ начин да затвори задълбочената и интересна дискусия.

Споменатите технически забележки не променят общото ми впечатление от тази отлично разработена, онагледена и коментирана дисертация, а целят единствено по-прецизното изготвяне на бъдещите научни трудове на ас. Десислава Крушовлиева.

Макар и критерий Е да не е включен в минималните изисквания на ЗРАСРБ за ОНС „доктор“, за отбелязване са петте участия на докторантката в научни проекти, някои от които национални. Това е отличен атестат най-вече за научната група, в която тя работи, но също предполага, че занапред ще помогне на ас. Десислава Крушовлиева самостоятелно да подготвя, изпълнява и отчита проекти.

Нямам препоръки за бъдещи изследвания, защото съм убеден, че изследователската активност под ръководството на проф. Яна Чекаларова е твърде интензивна, добре планирана и с фокус върху изникващите в хода на експериментите въпроси, на които, според ресурсите на екипа, ще се обърне необходимото внимание.

8. Автореферат

Авторефератът е твърде подробен и е според изискванията. Той отразява основните резултати в дисертацията, съдържа Изводи, Приноси, Публикации и Участия в конференции. Намирам го за доста подробен – съдържа 82 стр. За сравнение дисертационният труд без литературата е 119 стр. освен това от общо 42 фигури – 32 са в автореферата, както и двете таблици. Той обаче не съдържа множеството цитирани в раздел V. Обсъждане публикации.

9. Въпроси към докторантката

9.1. Фигура 2 авторска ли е? Ако не е – трябвало е да се посочи откъде е взета.

9.2. Как се различават нивата на мелатонин в кръвната плазма на плъх при пинеалектомия спрямо контролни животни? Доколко продуцираният от други клетки мелатонин е в състояние да покрие мелатониновия дефицит (особено при плъхове на средна възраст) или наблюдаваната функционална компенсация при плъхове, претърпели пинеалектомия, се извършва предимно по мелатонин-независим механизъм?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на ас. Десислава Здравкова Крушовлиева **съдържа оригинални научни данни за физиологичното влияние на пинеалектомията върху когнитивни процеси, поведението и някои регулаторни белтъци, и връзката им със стареенето при плъх**, които са публикувани и **отговарят на изискванията** на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените материали и резултати **напълно** съответстват и на изискванията от Правил-

ника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на ИНБ-БАН, утвърден през 2021 г.

Дисертационният труд показва, че докторантката ас. Десислава Крушовлиева **притежава** необходимите теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Физиология на животните и човека - Поведенческа физиология“, има необходимите за изследовател усърдие и постоянство, както и способността за самостоятелно и в екип провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, две публикации, постигнати резултати, изводи и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на ас. Десислава Здравкова Крушовлиева в докторска програма по „Физиология на животните и човека - Поведенческа невробиология“

05. 09. 2025 г.

Изготвил рецензията:

Проф. Христо Гагов

REVIEW

From Prof. Dr. Hristo Stefanov Gagov
Faculty of Biology of Sofia University "St. Kliment Ohridski"
on a dissertation for the award of the educational and scientific degree 'PhD'
professional field 4.3. Biological Sciences,
scientific specialty "Animal and Human Physiology"

Author: Desislava Zdravkova Krushovlieva

Form of PhD study: Full-time PhD student

IBIR, Section: Reproductive Biotechnologies and Cryobiology of Gametes

Topic: "Investigation of the Effects of Melatonin Deficiency on Selected Aging Mechanisms in an Experimental Pinealectomy Model"

Scientific supervisor: Prof. Jana Tchekalarova, PhD, INB-BAS

1. General presentation of the procedure and the PhD student

A set of materials has been submitted, including the following documents:

- Application to the Director of INB-BAS for the initiation of the procedure for the defence of a dissertation
- Curriculum vitae in European format, signed by the doctoral student
- Copy of a higher education diploma in Molecular Biology – Master's degree in Animal and Human Physiology
- Protocol from a scientific seminar for preliminary discussion of the dissertation and the decisions taken regarding the initiation of the procedure and the composition of the scientific jury
- Dissertation
- Abstract
- List of scientific publications related to the dissertation topic
- Copies of the scientific publications
- List of participations in scientific forums
- List of noted citations
- Reference for compliance with the minimum requirements under Art. 9, para. 2 of the Act for the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADASRB), as well as with the minimum requirements adopted by the Scientific Council of INB for acquiring scientific degrees and academic positions at INB
- Other documents related to the course of the procedure.

The doctoral student has attached 2 publications in journals with an impact factor (IF).

All necessary documents have been submitted.

2. Brief biographical data about the PhD student

Assis. Prof. Desislava Zdravkova Krushovlieva is a graduate of Sofia University “St. Kliment Ohridski”, where in 2021 she obtained a Master’s degree in “Molecular Biology”, completing the Master’s program in “Animal and Human Physiology”. Since 2021, she has been working and studying in the specialty “Animal and Human Physiology” at INB-BAS.

3. Relevance of the topic and appropriateness of the goals and objectives

The research tasks developed in the dissertation are extremely relevant, given the complex processes of aging and the involvement of various endocrine dysfunctions in this process. The aging population worldwide, and especially in technologically advanced countries, directs researchers’ attention to the age-related degradation of organs and systems. In relation to the dramatic decline of the nervous system during aging, special emphasis is placed on the study of the central nervous system and its functions, as well as on the impact of various factors on the outcomes of different neurodegenerative processes and pathologies, such as Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease. The successful slowing down of age-related changes would not only improve the quality of life during this stage of human ontogenesis but would also allow the extension of the period of working activity, both effects being of great social importance.

The present dissertation is focused on the role of melatonin deficiency resulting from pinealectomy on life span and certain functions of the central nervous system in rats, aiming to clarify the role of this hormone, characterized by a pronounced circadian dynamic, in the processes of aging. In this way, the dissertation contributes to the clarification and resolution of certain aspects of the aforementioned global issues.

4. Knowledge of the problem

The cited 386 literary sources (66 of which are from 2020 to the present, representing about 17%), together with the detailed Literature Review spanning a total of 38 pages, leave no doubt that the doctoral candidate is well acquainted with the state of the research problem and makes use of the scientific literature with the necessary depth. The Literature Review examines an exceptionally wide range of topics in depth, and for this reason, I would also characterize it as ambitious.

5. Aims, objectives, and methods of the study

Behavioral tests were selected for a multifaceted investigation of the melatonin deficiency model induced by pinealectomy in rats, focusing on motor activity, anxiety, working and spatial memory, and object recognition in animals of different ages (3, 14, and 18 months). In addition to

these tests, ELISA analyses of hippocampal homogenates were performed to assess the heat shock proteins HSP70 and HSP90, as well as the transcription factor CREB. Immunohistochemical analysis of brain structures was also employed to examine the neurotrophin BDNF and the tropomyosin receptor kinase B (TrkB). The statistical analyses used are appropriate to the aims of the study.

6. Characteristics and evaluation of the dissertation work

The Results and Discussion section, which is 31 pages long, really contains results and discussion, because sometimes the unification of the two sections is aimed at covering up the lack of in-depth discussion. The many results convincingly support the conclusions made. They are excellently illustrated with 27 figures and six tables. This section contains data from sperm analysis and separation methods, as well as the influence of low doses of ionizing radiation (X-rays in computed tomography) and non-ionizing radiation (NMR) on functional indicators of spermatozoa. All included data are in connection with the implementation of the tasks of this dissertation work. The statistical processing used is adequate.

7. Assessment of publications on the dissertation work

The scientific publications containing results from the dissertation are two. They are in English and were published in journals with an impact factor: one in **Behavioral and Brain Functions** (2024), a high-ranking journal (Q1, 25 points), and the other in **Acta Morphologica et Anthropologica** (2022), which carries 10 points. Thus, a total of 35 points has been accumulated, exceeding the minimum required 30 points. In one of these articles, the applicant for this competition is the first author, and in the other, the second author. These articles have not yet been cited in Scopus (verified on 05.09.2025).

In addition, Assis. Prof. Desislava Krushovlieva is a co-author of four other publications indexed in Scopus on related topics, which were cited 18 times (verified on 05.09.2025). This demonstrates the doctoral candidate's intensive research experience (given that these publications are from the period 2024 to the present) on the effects of aging, melatonin, the angiotensin 1 receptor, and other factors on CNS functions, as well as her commitment to this line of investigation. It is worth noting the upward trend in citations, 6 in 2024, and 11 in 2025.

Also noteworthy are five conference presentations on the dissertation topic, in all of which Assis. Prof. Desislava Krushovlieva is the first author.

8. Impressions of the Doctoral Candidate

I have known Assis. Prof. Desislava Krushovlieva has been a Master's student at the Department of *Animal and Human Physiology* at the Faculty of Biology. Even then, she impressed me as a motivated student with a strong interest in biological knowledge and a desire for scientific work. In my compulsory course *Physiology of Excitable Cells*, she received an excellent grade.

Although Criterion E is not included in the minimum requirements of the Act for the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADASRB) for the educational and scientific degree "Doctor," it is worth noting the five research projects in which the doctoral candidate has participated, some of which are national. This is an excellent attestation primarily for the research group in which she works. Still, it also suggests that in the future, Assis. Prof. Desislava Krushovlieva will be well prepared to design, execute, and report on research projects.

I have no recommendations for future studies, as I am convinced that the research activity under the supervision of Prof. Jana Tchekalarova is highly intensive, well-planned, and focused on the questions arising during the experiments, which, according to the team's resources, will receive the necessary attention.

9. Abstract

The abstract is very detailed and meets the formal requirements. It reflects the main results of the dissertation and contains Conclusions, Contributions, Publications, and Conference Participation. I find it quite comprehensive—it consists of 82 pages. For comparison, the dissertation itself, excluding the literature, is 119 pages. Of the total 42 figures, 32 are included in the abstract, as well as both tables. However, it does not include the papers cited in Section V: *Discussion*.

Questions for the Doctoral Candidate

9.1. Is Figure 2 original? If not, the source should have been indicated.

9.2. How do the melatonin levels in plasma differ in pinealectomized rats compared to control animals? To what extent can melatonin produced by other cells compensate for the melatonin deficit (at least in middle-aged rats), or is the observed functional compensation in pinealectomized rats primarily mediated via melatonin-independent mechanisms?

10. Critical remarks and recommendations

Critical Remarks. I have no substantive criticisms, but I did notice some technical shortcomings. On p. 15, penultimate paragraph, it is unclear which of the four cited articles supports

the statement that “Melatonin levels may be influenced by substances such as caffeine and oral contraceptives ...”; in such cases, it is advisable to indicate the specific effect (e.g., increase, decrease). In section 1.4., first paragraph, citations are given collectively at the end rather than after each statement. Some citations with two authors are written as A1 and A2 (A1 & A2, year); in such cases, the year alone in parentheses would suffice. On p. 40, line 9, the expression “и т.н.” (etc.) is used instead of the correct “и т. нар.” (so-called). In the List of Abbreviations, ROR, REV-ERB, TRX-1, COPD, and Cry1/2 are missing, the latter being quite different from the abbreviation Cry introduced earlier. The electron transport chain is abbreviated as ETK, which stands for electron transport kinetics. On p. 27, paragraph 4, the abbreviation UTMD correctly refers to Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction, and not to the Utah Medical Products indicated in the text. Alzheimer’s disease is abbreviated in two different ways—AD and BA. The text contains a large number of abbreviations, which at times hinder readability. Some are used only once, such as lipopolysaccharides (LPS) or phosphate buffer (PB), which I consider unnecessary.

The numbering of only odd pages is inconvenient. The final sentence of the Discussion has no logical connection with the preceding text and would be better replaced by another one that appropriately concludes the thorough and engaging discussion.

These technical remarks do not affect my overall impression of this excellently developed, well-illustrated, and well-commented dissertation. Their sole purpose is to encourage greater precision in the preparation of Assoc. Prof. Desislava Krushovlieva’s future scientific works.

CONCLUSION

The dissertation of Assoc. Prof. Desislava Zdravkova Krushovlieva contains original scientific data on the physiological effects of pinealectomy on cognitive processes, behavior, and certain regulatory proteins, as well as their relation to aging in rats. These results have been published and comply fully with the requirements of the Law for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ZRASRB) and its implementing regulations. The presented materials and results also meet the requirements of the Rules for the Awarding of Scientific Degrees and the Occupation of Academic Positions at the Institute of Neurobiology – BAS, approved in 2021.

The dissertation demonstrates that the doctoral candidate, Assoc. Prof. Desislava Krushovlieva, possesses the necessary theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty “Physiology of Animals and Humans (Behavioral Physiology),” as well as the diligence, perseverance, and ability to conduct scientific research both independently and collaboratively.

For the reasons stated above, I confidently give a positive evaluation of the conducted research, as presented in the reviewed dissertation, abstract, two publications, achieved results, conclusions, and contributions, and I recommend that the honorable scientific jury award the educational and scientific degree of ‘Doctor’ to Assis. Prof. Desislava Zdravkova Krushovlieva, the doctoral program in Animal and Human Physiology.

05.09.2025

Prepared by:

Prof. Hristo Gagov, PhD