

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Христина Христова Ночева-Димитрова, дм,
Медицински Университет - София, Медицински Факултет,
Каедра Физиология и Патифизиология,

въз основа на Заповед № 45 / 11.08 2025 г., на основание чл.10 от Закона за
развитието на академичния състав в Република България,
и с решение на заседание на НЖ (Протокол от 29.07.2025 г.),

във връзка с присъждане на ОНС „Доктор” по научна специалност „Физиология на
животните и човека” към направление „Поведенческа невробиология” в Институт
по невробиология-БАН

на дисертационен труд на тема:

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

представен от

Десислава Здравкова Крушовлиева - задочен докторант
към направление “Поведенческа невробиология”, ИНБ-БАН

Докторантката е представила за процедурата по защитата всички
необходими материали, документи и справки. Декларирам, че нямам съавторство в
публикациите на кандидатката, както и друг конфликт на интереси.

Десислава Здр. Крушовлиева завършва ВСУ, международни икономически
отношения, към Варненски свободен университет "Черноризец Храбър" с
професионална квалификация икономист през 2005 г., а през 2021 г. -
Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ с
професионална квалификация магистър „Физиология на животните и човека“.

Владее английски и немски език.

От м. септември 2022 г. Д. Крушовлиева е докторант по научната специалност „Физиология на животните и човека“ към Института по невробиология на БАН.

Докторантката е изпълнила успешно и в срок индивидуалната си образователна, научна и публикационна програма и е отчислена с право на защита.

Дисертационният труд включва 152 страници и е структуриран както следва: Заглавна страница и благодарности – 2 стр., Съдържание – 3 стр., Списък на съкращения - 5 стр., Увод - 2 стр., Литературен обзор - 37 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материали и методи - 15 стр., Резултати - 36 стр., Обсъждане - 12 стр., Изводи - 1 стр., Приноси - 2 стр., Библиография (включваща 335 заглавия) - 34 стр, списъци на проекти, публикации, цитирания и участия в научни форуми – 2 стр.

Мелатонинът е хормон, произвеждан от епифизната жлеза през нощта в условията на „нормално“ редуване на светло и тъмно. Негова основна физиологична функция е организиране синхронизацията на циркадианната ритмика на организма. С оглед на това ефектът му рефлектира и върху имунната и антиоксидантната защита, хемостазата, глюкозната обмяна; литературните данни подкрепят и наличието на връзка между дефицита на мелатонин и стареенето. Премахването на епифизата, от своя страна, закономерно би предизвикало мелатонинов дефицит. ***Оттук темата на дисертационния труд за проучване влиянието на мелатониновия дефицит върху определени аспекти на стареенето изглежда логично формулирана.***

От друга страна, увеличаващата се продължителност на живота (поне в някои части на света), наред с намаляване броя на ражданията води до все по-„застаряващо“ население на планетата, поставяйки редица предизвикателства в икономически и социален план, както и по отношение на здравеопазването. Възможността за вникване в конкретните механизми на процеса стареене би могло да подскаже способи за неговото забавяне и евентуално положително повлияване на някои от неблагоприятните му аспекти. Това, от своя страна, прави ***темата на дисертационния труд актуална и е перспектива за практическа насоченост на нейните приноси открития.***

Обзорът на дисертационния труд е насочен към мелатонина и представлява изчерпателно обобщение на известното към момента по отношение на физиологичните функции на хормона и връзката му с процесите на стареене. По-специално внимание е отделено на връзката между мелатонина и функционалното състояние на сърдечно-съдовата, нервната, дихателната системи, както върху зрението и въглехидратната обмяна, за които е известно, че са сред най-често засегнатите в процеса на остаряване. Разгледани са и известни към момента конкретни връзки между стареенето и мелатониновия дефицит на молекулярно ниво. Изтъкната е и изключително интересната теория за налична „програма за стареене“ в епифизата, което още веднъж **подкрепя адекватността на избраната методика.**

Целта на дисертацията - да бъде изследвана ролята на мелатониновия дефицит в процеса на стареене, както и предполагаемите механизми, чрез които този хормон модулира скоростта и характера на възрастовите промени, **отговаря на посоченото заглавие.**

Формулираните основни задачи включват проследяване на промени в различни показатели в 3 възрастови категории животни: 3-, 14- и 18-месечни, като за всяка възраст има контролна (шам-оперирана) и експериментална (с ефективна пинеалектомия) група, или общо 6 групи, което, според мен, **гарантира коректността на изводите.**

За всяка от 6-те групи се проследяват продължителност на живота, двигателна активност, работна, краткосрочна пространствена и разпознавателна памет; оценява се състоянието на тревожност, във връзка с което се определят плазмен кортикостерон и топлинно-шокови протеини HSP70 и HSP90 във фронтална кора и хипокамп; изследва се ролята на BDNF/ERK1/2/CREB сигналния път в хипокампа. **Така формулираните задачи обещават, при адекватното им изпълнение, да „отговорят“ на поставената цел** – разкривайки някои аспекти на липсата на мелатонин в процеса на стареене, както и възможни механизми за наблюдаваните ефекти.

Опитната постановка и поетапното ѝ изпълнение са изчерпателно описани, като отделните опити са онагледени с фигури (№11 – за проследяване на двигателна активност и преживяемостта; №12 – за изследване на емоционалния статус и тревожност; №13 – за изследване на когнитивните и паметови промени). **Конкретно използваните методи са целесъобразни съгласно актуалните литературни данни** – напр. използването на тестовете с повдигнат кръстосан лабиринт, светло-тъмно и неохипофагията за изследване на тревожност/безпокойство, както и използването на Y-maze-теста за изследване на работната и краткосрочната пространствена памет. Някои от тестовете (напр. за изследване на емоционалния статус и тревожност) са удачно комбинирани с биохимични анализи (изследване на плазмени нива на кортикостерон), което, от една страна, дава **по-пълна информация и прави изводите по-аргументирани, а, от друга, показва внимателния дизайн на опитите и задълбочените познания на кандидатката при тяхното планиране.**

Описанието на резултатите би могло да е малко по-структурирано, имайки предвид факта, че наличието на т. нар. „шам“- и „пин“-групи, включващи животни на различна възраст, предполага сравняването както по показател „възраст“, така и по показател „пинеалектомия“. Включването на елементи на анализ още в раздела „Резултати“ на моменти затруднява читателя. Независимо от това, **резултатите са прецизно илюстрирани с фигури, показващи конкретните стойности и статистическата достоверност между отделните групи.**

Анализът на получените собствени данни диференцира тяхното конкретно значение – приносно или потвърдително. Посочени са сходствата с докладвани резултати от други изследователски екипи, както и вероятните причини в случаите на разминаване. Направен е допълнителен анализ на достъпните литературни данни с оглед обясняване на получените по докторския труд резултати. Съпоставят се и се обобщават резултатите от отделните групи изследвания - напр. отчетените нива на тревожност с нивата на кортизол и *heat-shock*-протеините, както и взаимовръзката между нарушенията в паметта и промените в експресията на BDNF, TrkB, ERK1/2 и pERK1/2 в определени мозъчни участъци, което придава

завършеност на целия труд. Подчертава се и значението на получените резултати като отправна точка за евентуални бъдещи научни търсения.

Приемам формулировката на изводите на докторантката Десислава Здравкова Крушовлиева, както и отчетените приноси.

В заключение, касае се за научен труд, който почива на известните данни за значението на мелатонина за адекватната регулация на физиологичните процеси в организма, но разкрива ефектите от неговия дефицит за възникването на конкретни патологични отклонения по отношение на двигателната активност, психо-емоционалното състояние и когнитивните функции. Направените изводи се подкрепят от рационално подбрани изследователски методи, включващи наблюдение, поведенчески тестове, биохимични и имунохистохимични изследвания. Коректно са отбелязани и ограниченията на проведеното проучване.

Авторефератът отразява коректно съдържанието на дисертационния труд.

Докторантката е представила 2 публикации (**20 + 10 т.**), едната от които е цитирана (*Wang L, Wu L, Wang T, et al. Gandou Bushen Decoction Ameliorates Cognitive Impairment in Wilson Disease Model TX Mice by Regulating Melatonin Synthesis via the SIRT3/FOXO3a Pathway. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2025 Jan 20;56(1):102-111. doi: 10.12182/20250160602. - 5 т.*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на описаното по-горе, препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност “Физиология на животните и човека”, на Десислава Здравкова Крушовлиева, задочен докторант към направление “Поведенческа невробиология”, ИНБ-БАН, за дисертационния ѝ труд “Проучване

влиянието на мелатониновия дефицит върху някои механизми на стареене при експериментален модел на пинеалектомия”.

/доц. д-р Христина Ночева, дм/

София, 10.09.2025 г

SCIENTIFIC OPINION

by Assoc. Prof. Hristina Hristova Nocheva-Dimitrova, MD, PhD,
Medical University - Sofia, Faculty of Medicine,
Department of Physiology and Pathophysiology,

Pursuant to Order № 45 / 11.08.2025,
and on the basis of Art. 10 of the Act on the Development of the Academic Staff in the
Republic of Bulgaria,
and by Decision of a Meeting of the Academic Council (Protocol from 29.07.2025),

In connection with the award of the Educational and Scientific Degree "PhD" in the
scientific specialty "Animal and Human Physiology" in the field of "Behavioral
Neurobiology" at the Institute of Neurobiology-BAS

of of a PhD thesis:

**STUDY OF THE INFLUENCE OF MELATONIN DEFICIENCY ON SOME AGING
MECHANISMS IN AN EXPERIMENTAL PINEALECTOMY MODEL**

presented by

Desislava Zdravkova Krushovlieva - part-time doctoral student
in the field of "Behavioral Neurobiology", Institute of Neuroscience-BAS

The doctoral candidate has submitted all necessary materials, documents and
references for the defense procedure. I declare that I have no co-authorship in the
candidate's publications, as well as no other conflict of interest.

In 2005 Desislava Zdr. Krushovlieva graduated from the Faculty of Economics,
International Economic Relations, at the Varna Free University "Chernorizets Hrabar"
with a professional qualification in Economics, and in 2021 – from the Faculty of Biology
of Sofia University "St. Kliment Ohridski" with a professional qualification in Master of
Science in "Animal and Human Physiology".

Speaks English and German.

Since September 2022, D. Krushovlieva has been a doctoral student in the scientific specialty "Animal and Human Physiology" at the Institute of Neurobiology of the Bulgarian Academy of Sciences.

The doctoral student has successfully completed her individual educational, scientific and publication program on time and has been discharged with the right to defend her thesis.

The dissertation includes 152 pages and is structured as follows: Title page and acknowledgements – 2 pages, Table of contents – 3 pages, List of abbreviations - 5 pages, Introduction - 2 pages, Literature review - 37 pages, Aim and objectives - 1 page, Materials and methods - 15 pages, Results - 36 pages, Discussion - 12 pages, Conclusions - 1 page, Contributions - 2 pages, Bibliography (including 335 titles) - 34 pages, lists of Projects, Publications, Citations, and Participations in scientific forums - 2 pages.

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland at night under conditions of "normal" light and dark cycles. Its main physiological function is to organize the synchronization of the body's circadian rhythms. In view of this, its effect also reflects on the immune and antioxidant defense, hemostasis, glucose metabolism; literature data also support the existence of a relationship between melatonin deficiency and aging. Removal of the pineal gland, in turn, would naturally cause melatonin deficiency. ***Hence, the topic of the dissertation to study the influence of melatonin deficiency on certain aspects of aging seems logically formulated.***

On the other hand, increasing life expectancy (at least in some parts of the world), along with a decrease in the number of births, is leading to an increasingly "aging" population on the planet, posing a number of challenges in economic and social terms, as well as in terms of health care. The possibility of gaining insight into the specific mechanisms of the aging process could suggest ways to slow it down and possibly positively influence some of its unfavorable aspects. This, in turn, makes ***the topic of the dissertation relevant and with a potential for a practical direction of its contributing discoveries.***

The dissertation review focuses on melatonin and represents a comprehensive summary of what is currently known regarding the physiological functions of the

hormone and its relationship to aging processes. Particular attention is paid to the relationship between melatonin and the functional state of the cardiovascular, nervous, respiratory systems, as well as vision and carbohydrate metabolism, which are known to be among the most frequently affected in the aging process. Specific currently established connections between aging and melatonin deficiency at the molecular level are also examined. The extremely interesting theory of an existing "aging program" in the pineal gland is also highlighted, which once again ***supports the adequacy of the selected methodology.***

The aim of the dissertation - to investigate the role of melatonin deficiency in the aging process, as well as the putative mechanisms by which this hormone modulates the rate and nature of age-related changes, ***corresponds to the specified title.***

The formulated main tasks include monitoring of changes in various indicators in 3 age categories of animals: 3-, 14- and 18-month-old, with a control (sham-operated) and experimental (with effective pinealectomy) group for each age, or a total of 6 groups, which, in my opinion, ***guarantees the correctness of the conclusions.***

For each of the 6 groups, life expectancy, motor activity, working- and short-term spatial, as well as recognition memory were monitored; anxiety was assessed, in connection with which plasma corticosterone and heat shock proteins HSP70 and HSP90 were determined in the frontal cortex and hippocampus; the role of the BDNF/ERK1/2/CREB signaling pathway in the hippocampus is being investigated. ***The tasks formulated in this way promise, if adequately implemented, to "meet" the set goal*** – revealing some aspects of melatonin deficiency in the aging process, as well as possible mechanisms for the observed effects.

The experimental setup and its step-by-step implementation are comprehensively described, with individual experiments illustrated with figures (№ 11 – for monitoring motor activity and survival; №12 – for the study of emotional status and anxiety; №13 – for the study of cognitive and memory changes). ***The specific methods used are appropriate according to current literature data*** – e.g. the use of the elevated plus maze, light-dark, and neohypophagia tests to study anxiety/worryness, as well as the use of the Y-maze test to study working- and short-term spatial memory. Some of the tests (e.g. for

studying emotional status and anxiety) are successfully combined with biochemical analyses (study of plasma corticosterone levels), which, on the one hand, gives *more complete information and makes the conclusions more well-argued*, and, on the other hand, *it shows the careful design of the experiments and the candidate's in-depth knowledge in their planning*.

The description of the results could be a little more structured, considering the fact that the presence of so-called "sham" and "pinealectomy" groups, including animals of different ages, implies comparison by both the "age" and "pinealectomy" indicators. Including elements of analysis right in the "Results" section sometimes makes it difficult for the reader. Nevertheless, *the results are precisely illustrated with figures showing the specific values and statistical significance between the individual groups*.

The analysis of the obtained own data differentiates their specific significance – contributory or confirmatory. Similarities with reported results from other research teams are indicated, as well as the probable reasons in cases of discrepancy. An additional analysis of the available literature data was conducted with a view to explaining the results obtained in the doctoral thesis. The results of the individual groups of studies are compared and summarized - e.g. the reported levels of anxiety with the levels of cortisol and heat-shock proteins, as well as the relationship between memory impairment and changes in the expression of BDNF, TrkB, ERK1/2 and pERK1/2 in certain brain regions, which gives completeness to the entire work. The importance of the results obtained as a starting point for possible future scientific research is also emphasized.

I accept the formulation of the conclusions of the doctoral student Desislava Zdravkova Krushovlieva, as well as the reported contributions.

In conclusion, this is a scientific work that is based on known data on the importance of melatonin for the adequate regulation of physiological processes in the body, but reveals the effects of its deficiency on the occurrence of specific pathological deviations in terms of motor activity, psycho-emotional state and cognitive functions. The conclusions drawn are supported by rationally selected research methods, including

observation, behavioral tests, biochemical and immunohistochemical studies. The limitations of the study are also correctly noted.

The abstract correctly reflects the content of the dissertation work.

The doctoral student has presented 2 publications (**20 + 10** points), one of which is cited (*Wang L, Wu L, Wang T, et al. Gandou Bushen Decoction Ameliorates Cognitive Impairment in Wilson Disease Model TX Mice by Regulating Melatonin Synthesis via the SIRT3/FOXO3a Pathway. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2025 Jan 20;56(1):102-111. doi: 10.12182/20250160602. - 5* points).

CONCLUSION

Based on the above, I recommend to the Scientific Jury to award the educational and scientific degree "PhD" in professional field 4.3. Biological sciences, scientific specialty "Animal and Human Physiology", to Desislava Zdravkova Krushovlieva, part-time doctoral student in the field of "Behavioral Neurobiology", Institute of Neurobiology-BAS, for her dissertation work "Study of the influence of melatonin deficiency on some aging mechanisms in an experimental pinealectomy model. ".

/Assoc. Prof. Hristina Nocheva, MD, PhD/

Sofia, 10.09.2025