

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Петко Пенков Маринов, д.м.

Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“

Декан на Факултет по фармация, Медицински университет – Варна

Относно: процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ с кандидат Симона Александрова Александрова

Със заповед № 11/03.02.2023 г. на Директора на Института по невробиология съм избран за член на Научно жури, а на основание Протокол №1/31.01.2023 г. съм определен да изготвя становище по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ с кандидат Симона Александрова Александрова.

Тема: „Невропротективни механизми в ефектите на елаговата киселина върху експериментален модел на Паркинсонова болест при плъхове“

Област на висшето образование: 7. „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление: 7.1. „Медицина“

Научна специалност: „Фармакология“

Научен ръководител: проф. д-р Любка Танчева, д.ф.

Форма на докторантурата: задачна форма на обучение

Научно направление: „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“, при Института по невробиология, БАН

Процедурата по конкурса е спазена и е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Българската академия на науките.

Биографични данни и професионална квалификация:

Маг. фарм. Симона Александрова Александрова е родена на 15.05.1985 г. През 2003 г. започва обучението си във Фармацевтичен факултет към Медицински университет София. Дипломира се през 2008 година. Докторантът е с изключително богат практически опит в областта на клиничните изпитвания. Започва работа като администратор клинични изпитвания. В периода февруари 2009 – юни 2010 г. е магистър-фармацевт в аптека от открит тип. От юни 2010 г. до януари 2013 г. е сътрудник клинични изпитвания в Pfizer Люксембург SARL клон България. В следващите 6 години е сътрудник клинични изпитвания и Мениджър проекти в Новартис. От м. януари 2019 г. до м. ноември 2019 г. е Медицински научен сътрудник в PRA Health Sciences., след което и до момента е Регионален мениджър клинични изпитвания в Pfizer Люксембург SARL клон България. Маг. фарм. Симона Александрова притежава магистърска степен по обществено здраве и здравен мениджмънт от Факултета по обществено здраве на Медицински университет София, както и професионална квалификация в областта на защита и хуманно отношение към опитни животни, използвани за научни или образователни цели в Лесотехнически университет София. Владее отлично английски език.

Актуалност на темата:

Невродегенерацията е многофакторен процес, който включва различни цитотоксични механизми, водещи до загуба на нервни клетки. Невровъзпаление, ексцитотоксичност, редокс-активни тежки метали, увеличени нива на свободни радикали, увреждане на ендогенните клетъчни защитни механизми, митохондриална дисфункция, понижена експресия на трофични фактори в нервната тъкан – всички тези процеси имат роля в патогенезата на невродегенеративните заболявания (НДЗ). Експресията на проапоптотични протеини, която

води до невроална смърт, също е ключов фактор за възникването и прогресията на тези заболявания. Все още липсват нови и ефикасни терапевтични средства за контрол и ефективно лечение на тези заболявания. В резултат на неефективността на средствата, таргетиращи единични механизми, в последните години расте интересът към природните средства, които са известни със своята плурипотентност и отличен профил на безопасност

Природните средства притежават комплексен невропротективен ефект, който е резултат не само от техния добре известен антиоксидантен ефект, но също така се дължи и на противовъзпалителния им ефект, ролята им за предотвратяване на образуването на патологични белтъци, техните хелатиращи свойства, предотвратяване натрупването на тежки метали в мозъка, както и на способността им да регулират клетъчната и митохондриална хомеостаза

От медицинска гледна точка, способността на тези биоактивни молекули да улавят свободните радикали ги прави потенциални кандидати за терапевтични и профилактични средства за повлияване на НДЗ. Освен това, биоантиоксидантите добавени като храна или хранителни добавки имат отличен профил на безопасност с ограничена появя на нежелани реакции. Подкрепата на нанотехнологиите за подобряване доставянето им в мозъка, контролирането на освобождаването и предотвратяването на бързото им разграждане и екскреция е от основно значение. Някои биоантиоксиданти, получени от естествени продукти, показват поредица от свойства, потенциално полезни за защита на ЦНС от невродегенерация

Мощният антиоксидантен потенциал на ЕК носи славата на нара като най-мощния *in vitro* антиоксидант. ЕК е вещества, което повлиява голям брой клетъчни пътища на сигнализация и има потенциал да забави възникването и развитието на НДЗ. ЕК притежава изразен невропротективен ефект, опосредстван от нейния антиоксидантен капацитет, хелиращи свойства, способността за активиране на различни сигнални пътища, както и способност за повлияване на митохондриалната увреда. Всичко това прави ЕК потенциален кандидат за превантивен и терапевтичен агент, който би имал способността да повлияе по мултирегулаторен механизъм многофакторната патогенеза на НДЗ.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 156 страници. Онагледен е с 5 таблици и 14 фигури. Литературният обзор включва 368 източника, от които 1 е на български език и 367 са на латиница. Дисертационният труд е структуриран, съобразно класическия модел и включва: Съдържание и използвани съкращения – 6 страници; Въведение – 2 страници; Литературен обзор – 56 страници; Цел и задачи – 1 страница; Материал и методи – 13 страници; Резултати – 13 страници; Обсъждане – 12 страници; Изводи – 1 страница; Приноси – 1 страница; Публикации, свързани с дисертационния труд – 1 страница; Участия в научни форуми, свързани с дисертацията – 2 страници; Използвана литература – 48 страници;

Въведение

Въпреки успехите и достиженията на съвременната медицина, налице са и непосредствените медицински нужди в лицето на различни хронични заболявания, чието лечение с терапевтични агенти, насочени към единични патогенетични механизми, се оказва неефективно. Намаляващата ефикасност на някои синтетични лекарства и увеличаващите се противопоказания за употребата им правят понастоящем актуално използването на биологично активни вещества от естествен произход. Поради тази причина, интересът към фитотерапевтичните продукти, известни със своята плурипотентност и отличен профил на безопасност, нараства през последните години. Едно от широкопопулярните растения в традиционната медицина на много култури по света е нарът – *Punica granatum* L. В последните две десетилетия, с помощта на науката, става ясно, че нарът може потенциално да подпомогне лечението на една група заболявания с огромна социална и медицинска значимост, чиято етиология и патогенеза остават ненапълно изяснени и до днес – невродегенеративните заболявания.

Литературен обзор

В тази глава докторантът задълбочено разглежда актуалните данни относно медицинската и социална значимост на Болестта на Паркинсон, нейната етиология и патогенеза, механизмите на невродегенерация, клиничната картина, съвременните подходи в лечението. Акцентира се върху търсенията на нови терапевтични агенти за благоприятно фармакологично повлияване на болестта. Такива нови терапевтични средства могат да бъдат биоантиоксидантите с природен произход. Съобщават се данни от предходни изследвания на колектива, в който работи докторанта, които демонстрират положителния мултитаргетен ефект на някои природни антиоксидантни средства за превенция на възникването и прогресията на НДЗ – липоева киселина, миртенал, екстракт от охлюви, елагова киселина (ЕК). Посочва се биологичната протективна роля на полифенолите и в частност на елаготанините и елаговата киселина. Мощният антиоксидантен потенциал на ЕК носи славата на нара като най-мощния *in vitro* антиоксидант. Задълбочено са разгледани фармакокинетиката и фармакологичната им активност, техните известни позитивни ефекти при различни заболявания и състояния. Специално внимание е отделено на фармакологичните ефекти на ЕК върху ЦНС, включително и върху НДЗ.

Литературният обзор е написан на 56 страници, илюстриран е с 2 таблици и 5 фигури. Той е структуриран и представен прецизно и коректно, като обосновава категорично дисертабилността на темата.

Цел и задачи

Целта на представения дисертационен труд е да се изследват невропротективните ефекти на ЕК върху експериментален модел на Болест на Паркинсон (БП), предизвикан с унилатерално приложение на 6-хидроксидопамин (6-OHDA) на лабораторни плъхове. За решаване на целта са поставени 5 задачи:

изследване влиянието на ЕК върху динамиката и развитието на невродегенеративния процес

оценяване протективните ефекти на ЕК върху допаминергичните неврони при прилагане на невротоксина 6-OHDA

изследване на антиоксидантното действие на ЕК върху параметрите на оксидативния стрес в двете мозъчни хемисфери

сравнително проучване на протективното действие на ЕК върху двете хемисфери

интегриране на поведенческите и биохимичните данни чрез кълстераен анализ

Целта и задачите са конкретни и правилно формулирани.

Материал и методи

Опитите са провеждани върху полово зрели мъжки Wistar плъхове с тегло 250-300 г. Всяка експериментална група се състои от 8-10 животни. Опитните животни са разделени на три групи:

• SO (sham operated) контрола оперирани, с въведен 2 μ l физиологичен разтвор в стриатума; претретирани с интраперитонеално приложен физиологичен разтвор 0,5 ml/100 g телесно тегло;

• 6-OHDA - с интрастриатално въведен 2 μ l/10 μ g 6-OHDA; претретирани с интраперитонеално приложен с 0,5 ml/100 g телесно тегло физиологичен разтвор.

• 6-OHDA + EA - с интрастриатално въведен 2 μ L/10 μ g 6-OHDA; претретирани с интраперитонеално приложен с разтвор на ЕК в доза 50 mg/kg в 0,5 ml/100 g телесно тегло.

Всички процедури по третирането на животните както и експерименталните процедури са извършени в съответствие с правилата за работа с експериментални животни (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в

сила от 01.01.2013 г., издадена от Министерство на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09.11.2012 г.), в съответствие с Европейската директива 86/609/EEC и "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23), както и в съответствие с правилата на Комисията по этика на Института по невробиология към Българска академия на науките.

В експерименталната част са използвани следните вещества: 6-хидроксидопамин (6-OHDA) - Sigma-Aldrich, R-(–)-апоморфин хидрохлорид хемихидрат – Sigma-Aldrich, Етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТА) Sigma-Aldrich, Хлоралхидрат - Sigma-Aldrich, Елагова киселина – Ellagic acid hydrate 97% Alpha Aesar, Физиологичен разтвор (0.9% NaCl) – банка 0.9 % NaCl, 500 ml, BRAUN. Използван е експериментален токсин предизвикан модел на БП с помощта на (6-OHDA).

За оценка на невропротективните ефекти на ЕК са използвани *поведенчески методи* (Метод за определяне на степента на унилатералните лезии - апоморфинпредизвикани ротации; Метод за определяне степента и динамиката на моторната координация – Rotarod; Метод за определяне на степента и динамиката на обучението и паметта – тест за пасивно избягване), *bioхимични методи* (Неврохимично определяне на допамин; Антиоксидантна активност) и *статистически методи* с помощта на софтуер IBM SPSS 19. Йерархичен кълстериен анализ (centroid clustering method, squared Euclidean distance) е проведен на отделни резултати от Анализа на главните компоненти за първите два компонента за потвърждаване на кълстерирането на отделните плъхове в зависимост от третирането им.

Използваните методи спомагат и позволяват решаването на поставените цел и задачи.

Резултати и обсъждане:

Животните, третирани с ЕК показват съществено редуциране на броя на контролатералните ротации в минута, сравнено с 6-OHDA контролите, както и подобреие в нервномускулната координация, сравнено с контролната 6-OHDA група. ЕК предизвиква също и значимо намаляване на броя на паданията в минута при Rotarod теста. Този резултат потвърждава отчетеното подобреие в моторната координация, предизвикано от прилагането на ЕК. Претретирането с ЕК показва значително запазена паметова функция. Латентното време в експерименталната група е значително по-дълго. ЕК подобрява паметовата функция със 100% спрямо 6- OHDA контролата на седмица 3-та.

При плъховете, претретирани с ЕК се наблюдава статистически значимо увеличение на допаминовите нива в сравнение с 6-OHDA контролната група. ЕК води до повишаване на допаминовите нива със 108.9% ($p < 0.01$, $n = 4$) ипсилатерално и с 88.96% контролатерално. Възстановяващият ефект на ЕК върху допаминовите нива е по-силно изразен ипсилатерално. Способността на ЕК да превентира нивата на допамин в мозъка към увреждащото въздействие на невротоксина (6-OHDA) дава допълнително силно доказателство относно нейните невропротективни свойства *in vivo*.

Третирането на животните с невротоксина 6-OHDA води до значително увеличаване на нивата на липидна пероксидация и това е особено изразено в ипсилатералната хемисфера на мозъка (фиг. 13А). Също така се наблюдават понижени нива на GSH (фиг. 13Б) и понижена активност на каталазата (CAT) (фиг. 13Г), както ипсилатерално, така и контролатерално. Приложението на ЕК частично възстановява измененията в оксидативния статус, индуцирани от 6-OHDA. Подобрените когнитивни функции на гризачите, третирани с ЕК до голяма степен се дължат на нейния директен антиоксидантен ефект, като антипаркинсоновият ефект на ЕК се дължи на изразеното й антиоксидантно действие.

Установените протективни свойства на ЕК върху прогресията на БП се дължат на нейния потенциал да противодейства на невроналната смърт. Използването на ЕК, може да допринесе за облекчаване симптомите и за забавяне на прогресията на БП в експериментални условия.

Изводи:

Направените от докторанта 5 изводи са логичен завършек на резултатите от дисертационния труд.

Приноси:

Въз основа на дисертационния труд Симона Александрова извежда и формулира приноси, които напълно одобрявам.

Те имат оригинален научен и научно-приложен или потвърдителен характер – ЕК притежава изразени невропротективни ефекти върху плъхове с модел на унилатерална б-ОНДА индуцирана Болест на Паркинсон; установените защитни ефекти на ЕК върху плъхове с експериментална БП се дължат на мощно антиоксидантно действие и до понижаване на оксидативния стрес в мозъка и на способността на ЕК да увеличава допаминовите нива в мозъка, което води до забавяне прогресията на БП; ЕК повлиява предимноувредената хемисфера, където нивата на оксидативния стрес са чувствително по-високи от тези на интактната хемисфера; Установена е значителна промяна в допаминовите нива ипсилатерално при животните претретирани с ЕК;. Проведеният кълстереен анализ показва, че ЕК съществено забавя прогресията на БП посредством своите комплексни механизми.

Тези приноси обогатяват възможностите за благоприятно повлияване на пациентите с БП и имат определен научно-практически характер.

Публикационна активност:

Авторът представя 5 пълнотекстови публикации във връзка с дисертационния труд, като трите са в научни списания с импакт фактор. Открайват се две от публикациите, които са в списания от Квартил 1 и са с много висок импакт-фактор, съответно 7,675 и 6,208. В две от статиите тя е първи автор, което доказва личния принос на дисертанта при разработване на настоящата дисертация. Допълнително е представен списък с участия в 12 национални и международни научни форуми, свързани с дисертационния труд. В шест от тях дисертантът е първи автор и в три е втори автор.

Авторефератът съдържа 48 страници. Илюстриран е с 1 таблица и 7 фигури. Той е изгoten съгласно изискванията и отговаря напълно на целите, задачите и резултатите в дисертационния труд.

Заключение: Дисертационният труд на тема „Невропротективни механизми в ефектите на елаговата киселина върху експериментален модел на Паркинсонова болест при плъхове“ е актуален и третира важен интердисциплинарен проблем в областта на фармакологията, неврологията, гериятрията, рехабилитацията. Представеният труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Българската академия на науките и заложените в него критерии за ОНС „Доктор“. Ето защо давам своята положителна оценка и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за защитата на дисертационния труд и да присъдят на маг. фарм. Симона Александрова Александрова образователната и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. „Медицина“ по научна специалност „Фармакология“.

22.02.2023 г.

гр. Варна

Проф. д-р Петко Маринов, д.м

DISSERTATION OPINION

By Prof. Dr. Petko Penkov Marinov, MD, PhD
 Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy
 Dean of the Faculty of Pharmacy, Medical university - Varna

In reference with: Procedure for acquiring the educational and scientific degree "Doctor" of candidate Simona Aleksandrova Aleksandrova

With regards to order № 11/03.02.2023 r. by the Director of the Institute of Neurobiology I have been appointed member of Scientific jury and pursuant to Protocol №1/31.01.2023 r. I am appointed to provide opinion regarding procedure for acquiring the educational and scientific degree "Doctor" of candidate Simona Aleksandrova Aleksandrova.

Thesis topic: „Neuroprotective Mechanisms in The Effects of Ellagic Acid on Experimental Model of Parkinson's Disease in Rats” “

Field of Higher Education: 7. „Healthcare and Sports”

Professional Direction: 7.1. "Medicine"

Scientific specialty: „Pharmacology“

Scientific advisor: Prof. Lyubka Tancheva, PhD

Doctortal studies format: extramural education

Scientific direction: "Biological Effects of Natural and Synthetic Substances" at the Institute of Neurobiology, BAS

The procedure is performed in accordance with the requirements of the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria Act, the Regulations on its implementation, and Regulations on The Conditions and Order for Acquiring Scientific Degrees and For Holding Academic Positions at the Bulgarian Academy of Sciences.

Biography and professional qualifications:

Simona Aleksandrova Aleksandrova, MPharm was born on 15.05.1985. In 2003 she initiates her education at Faculty of Pharmacy at the Medical University of Sofia. She earns her degree in 2008. The PhD candidate has exceptionally rich practical experience in the area of clinical research. She began her career as clinical research administrator. Between February 2009 and June 2010 she worked as a pharmacist in a retail pharmacy. Between June 2010 and January 2012 she worked as Clinical research associate at Pfizer Luxembourg SARL Branch Bulgaria. In the following 6 years she works as Clinical research associate and Project manager at Novartis. Between January 2019 and November 2019 she worked as Medical scientific associate at PRA Health Sciences and after this and to date she holds the position of Regional clinical research manager at Pfizer Luxembourg SARL Branch Bulgaria. Simona Aleksandrova, MPharm holds Master's degree in Public health and healthcare management by the Faculty of Public Health at Medical University of Sofia as well as professional qualification in the area of protection and humane treatment of experimental animals used for scientific and educational purposes by the University of Forestry, Sofia. She is fluent in English.

Relevance of the dissertation topic:

Neurodegeneration is a multifactorial process which includes various cytotoxic mechanisms leading to neural loss. Neuroinflammation, excitotoxicity, redox-active heavy metals, increased levels, of free radicals, damage of cell endogenous defense mechanisms, mitochondrial dysfunction, decreased expression of trophic factors in the nervous system – all these processes play a role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (NDD). The expression of proapoptotic proteins which leads to neural cell death is also a key factor in the onset and progression of NDDs. Novel and effective therapeutic approaches for control and efficient treatment of NDDs are still an unmet need.

As a result of the inefficiency of the therapeutic agents targeting single mechanisms, the interest raises towards natural substances known for their pluripotency and excellent safety profile.

The natural substances exert complex neuroprotective effect which is a result not only of their well-known antioxidant properties but is also attributed to their anti-inflammatory effect, their role in pathological proteins formation prevention, their chelating properties as well as their capability to regulate cell and mitochondrial homeostasis.

From medical standpoint, the free radical scavenging properties of these bioactive substances is allowing them to serve as candidates for therapeutic and preventive agents for NDDs. free radicals. Besides, bioantioxidants as food and food additives demonstrate excellent safety profile with limited adverse reactions. Nanotechnology could support improving of bioantioxidant distribution in the brain and also provide sustained release and prevention of swift elimination and excretion and this would be of key significance. Some bioantioxidants obtained from natural products demonstrate variety of capabilities that are potentially beneficial to protect CNS from neurodegeneration.

The potent antioxidant potential of ellagic acid is what makes the pomegranate famous as the most potent in vitro antioxidant. Ellagic acid is a substance capable of influencing a variety of cell signal pathways and having the potential to delay the onset and progression of NDDs. Ellagic acid has pronounced neuroprotective effect due to its antioxidant capacity, chelating properties, ability to activate different signal pathways as well as restoring capability for mitochondrial damage. All these properties make ellagic acid a potential candidate for preventive and therapeutic agent capable to influence by a multi-target mechanism the multifactorial NDD pathogenesis.

Structure of The Dissertation

The dissertation consists of 156 pages, 5 tables and 14 figures. Literature review includes 368 titles, 1 of which is in Bulgarian and 367 are in English. The thesis is structured in accordance to the classical model and consists of: Table of contents and Used abbreviations – 6 pages; Introduction – 2 pages; Literature review – 56 pages; Aims and Objectives – 1 page; Materials and Methods – 13 pages; Results – 13 pages; Discussion – 12 pages; Conclusions – 1 page; Contributions – 1 page; Publications in relation to the dissertation – 1 page; Participation in scientific forums related to the dissertation – 2 pages; Bibliography – 48 pages.

Introduction

Despite the success and achievements of modern medicine, there still remain unmet medical needs by means of the inefficiency of chronic disease therapeutics that aim at a single pathogenetic mechanism. The decreasing efficacy of some synthetic drugs and the increasing contraindications for their use make the use of biologically active substances of natural origin relevant. As a result the interest towards phytotherapeutic products, known for their pluripotency and excellent safety profile, has grown in recent years. One of the widely popular plants in the traditional medicine of many cultures around the world is the pomegranate - *Punica granatum L.* In the last two decades scientific research has elucidated that the pomegranate could support the treatment of a group of diseases of enormous social and medical importance, whose etiology and pathogenesis remain not fully uncovered to this day - neurodegenerative diseases.

Literature review

In this chapter, the doctoral student thoroughly examines the currently available data on the medical and social significance of Parkinson's Disease, its etiology and pathogenesis, the mechanisms of neurodegeneration, the clinical manifestation, and contemporary therapeutic approaches. Emphasis is placed on the investigational research for novel therapeutic agents. Such novel therapeutic agents could be the bioantioxidants of natural origin. The team in which the doctoral student works reported data from previous studies demonstrating the positive multi-target effect of some natural antioxidant agents for the prevention of onset and progression of NDDs - lipoic acid, myrtenal, snail extract, ellagic acid (EA). The protective role of polyphenols and in particular of ellagotannins and ellagic

acid is indicated. The powerful antioxidant potential of EA brings the popularity of the pomegranate as the most powerful in vitro antioxidant. Pharmacokinetic properties and pharmacological activity of EA and ellagotannins, their beneficial effects in various diseases and health conditions are thoroughly examined. Special attention is paid to the pharmacological effects of EA on the CNS, including effects on NDDs.

The literature review is written on 56 pages, illustrated with 2 tables and 5 figures. It is structured and presented precisely and correctly, emphatically justifying the dissertability of the topic.

Aims and Objectives

The aim of the dissertation is to investigate the neuroprotective effects of EA on an experimental model of Parkinson's Disease (PD) induced by unilateral administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in laboratory rats. 5 objectives are set to achieve the aim of the dissertation:

To study the effect of EA on the dynamics and development of the neurodegenerative process.

To evaluating the protective effects of EA on dopaminergic neurons upon administration of neurotoxin 6-OHDA.

To study the antioxidant effect of EA on oxidative stress parameters in both cerebral hemispheres.

To comparatively study the protective effect of EA on the two hemispheres.

To integrate behavioral and biochemical data through cluster analysis.

The aims and objectives are specific and correctly formulated.

Materials and methods

The experiments were conducted on mature male Wistar rats weighing 250-300 g. Each experimental group consisted of 8-10 animals. Experimental animals are divided into three groups:

- SO (sham operated) control operated, with 2 µl saline injected into the striatum; pretreated with intraperitoneally administered saline 0.5 ml/100 g body weight

- 6-OHDA - with intrastratal introduced 2 µl/10 µg 6-OHDA; pretreated with intraperitoneally administered 0.5 ml/100 g body weight saline

- 6-OHDA + EA - with intrastratal introduced 2 µL/10 µg 6-OHDA; pretreated with intraperitoneally administered EA solution at a dose of 50 mg/kg in 0.5 ml/100 g body weight.

All animal treatment procedures as well as experimental procedures were carried out in accordance with the rules for working with experimental animals (Ordinance No. 20 of 01.11.2012 on the minimum requirements for the protection and humane treatment of experimental animals and the requirements for the objects for the use , their cultivation and/or delivery, in force from 01.01.2013, issued by the Ministry of Agriculture and Food, State Gazette No. 87 of 09.11.2012), in accordance with the European Directive 86/609/EEC and "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23), as well as in accordance with the requirements of the Ethics Committee at the Institute of Neurobiology at the Bulgarian Academy of Sciences.

The following substances were used in the experimental part: 6-hydroxydopamine (6-OHDA) - Sigma-Aldrich, R-(-)-apomorphine hydrochloride hemihydrate - Sigma-Aldrich, Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) Sigma-Aldrich, Chloral hydrate - Sigma-Aldrich Aldrich, Ellagic acid hydrate 97% Alpha Aesar, Saline (0.9% NaCl) - bottle 0.9% NaCl, 500 ml, BRAUN. An experimental toxin-induced model of PD using (6-OHDA) was used.

Behavioral methods were used to assess the neuroprotective effects of EA (Method for unilateral lesions severity assessment - apomorphine-induced rotations; Method for motor coordination status and dynamics assessment - Rotarod; Method for level and dynamics learning and memory assessment - passive avoidance test), biochemical methods (Neurochemical assessment of dopamine; Antioxidant activity) and statistical methods using IBM SPSS 19 software. Hierarchical cluster analysis (centroid clustering method, squared Euclidean distance) was performed on individual results of the Analysis of principal components for the first two components to confirm the clustering of individual rats by treatment.

The methods used provide for and enable the achievement of the set aims and objectives.

Results and Discussion:

EA-treated animals showed a significant reduction in the number of contralateral rotations per minute compared to 6-OHDA controls, as well as improvement in the neuromuscular coordination compared to the 6-OHDA control group. EA also lead to a significant reduction in the number of falls per minute in the Rotarod test. This result supports the reported improvement in motor coordination induced by EA application. Pretreatment with EA demonstrated significantly preserved memory function. Latency time in the experimental group was significantly longer. EA improved memory function by 100% over 6-OHDA control at week 3.

Rats pretreated with EA demonstrated statistically significant increase in dopamine levels compared to the 6-OHDA control group. EA resulted in an increase in dopamine levels by 108.9% ($p < 0.01$, $n = 4$) ipsilaterally and by 88.96% contralaterally. The restorative effect of EA on dopamine levels was more pronounced ipsilaterally. The capability of EA to buffer brain dopamine levels against the damaging effects of the neurotoxin (6-OHDA) provides further strong evidence for its neuroprotective properties *in vivo*.

Treatment of animals with the neurotoxin 6-OHDA resulted in significant increase in lipid peroxidation levels, and this was particularly pronounced in the ipsilateral brain hemisphere (Fig. 13A). Decreased GSH levels (Fig. 13B) and decreased catalase (CAT) activity (Fig. 13D) were also observed both ipsilaterally and contralaterally. Administration of EA partially restored the changes in oxidative state induced by 6-OHDA. The improved cognitive functions of rodents treated with EA are largely due to its direct antioxidant effect, whereas the antiparkinsonian effect of EA is due to its pronounced antioxidant action.

The established protective properties of EA on the progression of PD are due to its potential to prevent neuronal death. The use of EA may contribute to alleviating symptoms and delaying the progression of BP in experimental conditions.

Conclusions:

The 5 conclusions drawn by the doctoral student serve as a logical finale of the results of the dissertation.

Contributions:

Based on her dissertation, Simona Aleksandrova brings out and formulates contributions that I fully approve.

They have original scientific and scientific-applied or confirmatory nature - EA has pronounced neuroprotective effects on rats with a model of unilateral 6-OHDA induced Parkinson's disease; the established protective effects of EA on rats with experimental PD are result of the powerful antioxidant effect and the reduction of oxidative stress in the brain and to the ability of EA to increase dopamine levels in the brain, which leads to a delay in the progression of PD; EA primarily affects the damaged hemisphere, where levels of oxidative stress are significantly higher than those of the intact hemisphere; A significant change in dopamine levels was found ipsilaterally in animals pretreated with EA. The cluster analysis demonstrates that EA significantly delays the progression of PD through its complex mechanisms.

The above discussed contributions enrich the therapeutic opportunities for favorable treatment result in patients with PD and have a certain scientific and applied nature.

Publications:

The author presents 5 full-text publications related to the dissertation, three of which are in scientific journals with impact factor. Two of the publications stand out, which are in Quartile 1 journals and have a very high impact factor, 7.675 and 6.208, respectively. In two of the articles, she is the first author, which proves the personal contribution of the doctoral student in developing this dissertation. Additionally, a list of participations in 12 national and international scientific forums

related to the dissertation is presented. In six of them the dissertation student is the first author and in three she is second author.

The abstract contains 48 pages. It is illustrated with 1 table and 7 figures. It is prepared according to the requirements and fully meets aims, objectives and results of the dissertation.

Conclusion: The dissertation on "Neuroprotective mechanisms in the effects of ellagic acid on an experimental model of Parkinson's disease in rats" is relevant and discusses an important interdisciplinary problem in the fields of pharmacology, neurology, geriatrics, rehabilitation. The work presented fully meets the requirements of the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria Act, the Regulations for its Application and the Regulations for the Terms and Conditions for Acquiring Scientific Degrees and Holding Academic Positions in the Bulgarian Academy of Sciences and the criteria for acquiring the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" of the Bulgarian Academy of Sciences set forth in it. That is why I give my positive assessment and recommend the respected members of the Scientific Jury to vote positively for the defense of the dissertation and to award Simona Aleksandrova Aleksandrova, MPharm the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" in the field of higher education 7. Healthcare and sports, professional direction 7.1. "Medicine" in scientific specialty "Pharmacology".

22 Feb 2023

Varna

Prof. Dr. Petko Marinov, MD, PhD/