

СТАНОВИЩЕ

Върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност “Фармакология”, област на висшето образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

Автор на дисертационния труд: асистент Росица Живкова Милева, Тракийски университет, гр. Стара Загора

Тема на дисертационния труд: „Фармакогенетика на доксициклин и популационно моделиране при бозайници“

Изготвил становището: проф. д-р Теодора Петрова Попова, Лесотехнически университет, гр. София, област на висше образование „Аграрни науки и ветеринарна медицина”, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност “Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните”, определена за член на Научното жури със Заповед № 3363/17.12.2020 г. на Ректора на Тракийския университет.

• Кратко представяне на кандидата.

Росица Живкова Милева е завършила Тракийския университет в гр. Ст. Загора, където се е дипломирала в края на 2012 г. като Магистър ветеринарен лекар. През 2011 г. е преминала тримесечно обучение в гр. ХанOVER, Гелмания като студент по програмата „ЕРАЗЪМ”. Трудовият ѝ стаж по специалността започва през 2013 г. във ветеринарномедицинска амбулатория за дребни животни в гр. Стара Загора. От 14.07.2017 г. до сега тя е асистент в Секция “Фармакология”, катедра “Фармакология, физиология на животните и физиологична химия”. През този период Росица Милева е преминала редица допълнителни обучения като курс по “Медицински английски език”, по “Статистически софтуер за обработка на данни – основни методи”, по “Защита и хуманно отношение към опитни животни, използвани за научни или образователни цели”, обучение за работа с течно-хроматографска система с мас спектрометър LC/MS-MS и специализация в Утрехтския университет по “Популационно моделиране и клетъчно култивиране”. Участвала е в един уъркшоп и три уебинара на теми, свързани със съвременни лабораторни методи на работа. Росица Милева е зачислена в докторантура в самостоятелна форма на обучение със Заповед на Ректора на ТрУ № 2645/01.10.2019 г., с научен ръководител проф. д-р Анелия Миланова Кондева. Тя е изпълнила индивидуалния учебен план на докторантурата, положила е успешно изпити по специалността и със Заповед на Ректора на ТрУ № 2809/26.10.2020 г. е отчислена с право на защита.

• Обща характеристика и структура на дисертационния труд.

Дисертационният труд е написан на 145 стандартни страници. Той включва необходимите раздели съгласно общоприетите изисквания. След съдържанието на една страница са описани използваните съкращения. Следва уводът, който обхваща 2 ½ стр., литературният обзор е представен на 32 стр., целта и задачите – на 1 стр., използваните материали и методи – на 20 стр., получените резултати са отразени на 28 стр., обсъждането – на 30 стр. с обобщение – 4 стр., направените изводи са 6 на брой, представени на 1 ½ стр., литературният указател обхваща 18 стр., приносите са 7 на брой, написани на 1 стр., а на последната стр. са представени публикациите във връзка с дисертационния труд, участията в научни форуми и проекти. Дисертацията е структурирана правилно и целесъобразно, с адекватно съотношение между разделите.

• Актуалност на проблема.

Темата на представената дисертация е особено **актуална** в контекста на глобалното разпространение на полирезистентни микробни щамове и все по-ограничените възможности за избор на ефикасни средства за терапия на инфекциите. Особено важна предпоставка за успешно лечение е прецизното им дозиране. С оглед осигуряване на безопасна храна, тенденцията за ограничаване на употребата на антибиотици при продуктивните животни е предизвикателство пред ветеринарната медицина. Свободният избор на антимикробни средства за приложение при тези животни е все по-ограничен и затруднен. Това налага задълбочено проучване на фармакодинамиката и фармакокинетиката на антибиотиците от основните групи, прилагани във ветеринарната медицина, към които се отнасят и тетрациклините. В този аспект е от съществено значение прецизирането на тяхното дозиране, за което е важно проучването на свободните им плазмени концентрации, както и индивидуализирането на приложението им дори и когато се касае за големи групи животни. Данните за популационната фармакокинетика на антибиотици при редица видове животни са от съществено значение за проучване на възможностите за оптимизиране на дозовия им режим. Доксициклинът е широкоспектърен антибиотик, който се използва с успех за лечение на бактериални и протозойни заболявания при редица видове животни. Неговата фармакокинетика във връзка със значими източници на вариабилност не е добре характеризирана при някои видове като дребни преживни, зайци и др. Нейното проучване би допринесло за прецизиране и индивидуализиране на антибиотикотерапията при селскостопански животни, което е от особена важност за намаляване на риска от селекция на резистентни микробни щамове в селскостопански обекти и разпространението им в околната среда и по хранителната верига.

От тези проблеми произтича темата на представения дисертационен труд, чиято цел е посредством популационното моделиране и маркери като клинични и биохимични показатели да се характеризира прецизно поведението на антибиотика доксициклин при дребни преживни и зайци, за които има ограничена информация. Това е от значение за по-доброто познаване на източниците на вариации между третирания животни и прецизиране на употребата на този широко използван в практиката антибиотик.

• Степен на познаване на състоянието на проблема и творческа интерпретация на литературния обзор.

Уводът на дисертацията представя ясно и обосновано темата като показва задълбочено познаване на проблема. В **обзора на литературата** много добре са изтъкнати предизвикателствата пред ветеринарната медицина в антимикробната терапия. Дадена е характеристика на антибиотика доксициклин, представени са неговата фармакодинамика и фармакокинетика, включително и на формите със забавено освобождаване. Интерес представляват и представените данни за фармакокинетично-фармакодинамичното моделиране и популационни методи за фармакокинетичен анализ за оптимизиране терапията с този антибиотик при животни. Разгледани са методите за определяне на доксициклина в биологични тъкани и течности. Много от литературните данни са прегледно представени под формата на таблици (6 на брой), което считам за целесъобразен и ефективен подход. В **обобщението** на литературната информация е изтъкнато, че фармакокинетиката на доксициклина е добре проучена при редица бозайници, но недостатъчно при лактиращи животни, при дребни преживни и зайци. Фармакодинамичните характеристики на този антибиотик го правят приложим за контрол на инфекции, специфични за дребни преживни и зайци, което изисква добро познаване на фармакокинетиката му. Авторът не е открил в литературата информация за популационен фармакокинетичен анализ на доксициклина при дребни преживни животни и при зайци. Експерименталното получаване на такива данни обаче е необходимо за прецизиране на употребата на доксициклина и режима на дозирането му, което е предпоставка за

определяне на целта на дисертационния труд. Литературният обзор е изготвен и структуриран целесъобразно.

- **Цел, задачи, хипотези и методи на изследване. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд.**

Целта на дисертационния труд е ясно и правилно формулирана. Тя предвижда проучване на фармакокинетиката на доксициклин при дребни преживни и зайци, като фармакокинетичното моделиране да се корелира с клинични и биохимични показатели чрез методите на популационния фармакокинетичен анализ. **Задачите са пет на брой, ясно очертани. Те са подходящи и достатъчни за постигане на целта на изследванията.**

В раздела „Материали и методи“ прегледно са описани използваните опитни животни (38 на брой, овце, агнета, зайци и свине), съставът на дажбата им (ясно представен в три таблици), лекарствените вещества и реактиви. Експериментите са проведени съгласно Наредба №20/01.11.2012 г. на Българското законодателство за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им. Изчерпателно са описани експерименталните процедури и приложените методи на изследване (за извършване на необходимите анализи, за определяне на клинични биохимични параметри и на фармакокинетичния анализ), тяхното валидиране за определяне на доксициклин в биологични материали, изчисляване и сравняване на получените резултати. От представянето на данните в този раздел личи отличното познаване на приложените съвременни изследователски методи като високоефективна течна хроматография и др., които са напълно подходящи за успешно изпълнение на поставените задачи. Резултатите са обработени статистически. **Подбраните методи на изследване изцяло съответстват на поставената цел и задачите на дисертацията.**

- **Онагледеност и представяне на получените резултати.**

Резултатите от извършените изследвания напълно съответстват на поставените задачи. Те са представени ясно и прегледно в съответната последователност. Данните са много добре систематизирани и изложени в раздел „Резултати“, като са обобщени и отразени в **17 таблици** (те са общо 26, но 9 от тях са в предходните раздели) и **15 фигури**, от които много ясно могат да се видят и сравнят получените данни. Таблиците и фигурите са много добре оформени. Текстът към тях в раздела отлично подчертава и допълва представените данни. От него личи, че авторът в детайли владее приложените най-съвременни методи, тяхното целесъобразно използване, както и обработката и анализа на резултатите. Експериментите са извършени и отчетени прецизно, а резултатите са обработени и анализирани задълбочено и целесъобразно.

В този раздел от дисертацията пълноценно са представени всички получени данни от извършените изследвания, което показва високата компетентност на автора и умението му да прилага усвоените лабораторни методи на изследване и специализиран софтуер, както и да обобщава, представя и сравнява получените резултати. От тях се вижда, че **поставените задачи са изпълнени, което осигурява постигането на целта**

- **Обсъждане на резултатите и използвана литература.**

Разделът „Обсъждане“ съдържа подробен и задълбочен анализ, интерпретиране и сравняване на получените резултати, оценка на приложените методи и на възможностите им за бъдещо използване не само за изследователски, но и за практически цели. Разделът е структуриран в съответствие с поставените задачи. От него също личи високата компетентност на автора и умението му да тълкува и сравнява получените резултати. Дискусията е обстойна и пълноценна. Тук отново се откроява задълбочената подготовка и високата осведоменост на автора в областта на проучванията, както и познаването на литературните данни по въпроса. Той се представя като компетентен и перспективен специалист в научната област, владеещ съвременните методи на изследване и анализ на данните, с творчески подход към информацията, както и с изграден висок стил на

изложение на данните. Много добре представено е и **обобщението**, в което са очертани предимствата на използваните валидирани чувствителни методи за анализ и модели на изследване, както и перспективи за бъдещото им приложение.

Авторът е формулирал **шест извода**, които ясно и синтезирано отразяват най-важното от получените резултати в последователността на поставените задачи.

Литературният указател обхваща 202 източника и показва добрата осведоменост на автора за състоянието на проблема, предимно в чужбина. Само един от тях е на кирилица. Четири от източниците са на български автори, като този малък брой вероятно се дължи на това, че у нас няма достатъчно изследвания по темата и допълнително показва актуалността на проблема. Делът на източниците от последните 10 години е най-висок - над 36 %, което е указание за добра информираност на автора на съвременен ниво. Най-малко (11%) са източниците от преди 2000 г. Литературният указател е отлично оформен съгласно стандартните изисквания.

• Приноси на дисертационния труд.

Приносите, произтичащи от извършените изследвания и анализи, са общо 7. Те са ясно и синтезирано формулирани. **Всички са оригинални**, като два от тях са с приложен характер. В резултат на извършените проучвания за първ път е описана фармакокинетиката на орално приложен доксициклин посредством класическите методи за фармакокинетичен анализ при агнета в сравнение с възрастни овце. Установена е относително бавна резорбция и тенденция към бързо елиминиране. Високи концентрации на антибиотика са открити в млякото на лактиращи овце. При подобни проучвания при подрастващи и възрастни зайци не са установени различия между избраните възрастови групи. Важен принос са създадените за пръв път популационни фармакокинетични модели за характеризирани поведението на доксициклина при овце и зайци. Посредством разработения модел въз основа на данните за овце е установено влиянието на възрастта и свързаните с нея различия в телесната маса, развитието на храносмилателния тракт и функционирането на черния дроб върху фармакокинетиката на орално приложен доксициклин. Също така създаденият популационен фармакокинетичен модел въз основа на данните за зайци разкрива корелацията на някои биохимични показатели като албумин и ALT с основни фармакокинетични параметри на доксициклина като клирънс и обем на разпределение. С приложен характер е разработеният и валидиран метод с високоефективна течна хроматография с PDA детекция на доксициклин в плазма на овце, зайци, свине и мляко на овце, който може да бъде използван в бъдещи фармакокинетични проучвания. Филтрирането през микрофилтри дава възможност да се определят свободните концентрации на доксициклина. Създадената вследствие на проведените изследвания база данни за овце и зайци е основа за бъдещи фармакокинетични проучвания и прецизиране на дозовите режими с помощта на популационното фармакокинетично моделиране.

Препоръки за практиката не са представени. Считаю, че формулирането на такива препоръки би било от полза.

• Оценка на степента на личното участие на дисертанта в приносите.

В публикациите и в дисертационния труд ясно се очертава активното участие и съществения личен принос на ас. Росица Милева. Тя е самостоятелен автор на една от представените научни статии и водещ автор на останалите две, както и в двете участия с доклади на английски език на международни научни конференции, едната от които е проведена виртуално. Тя е ръководител на научноизследователски проект НП 07/2018 на тема „Валидиране на метод за определяне на тетрациклини в серум на овце/кози/зайци”, свързан с темата на дисертационния труд. Участвала е също в Университетски научен проект №01/2020 г. „Проучвания върху сорбцията на доксициклин върху фураж в зависимост от рН”. Всичко това, както и високата компетентност и прецизност на

представянето на всички раздели от дисертацията дава основание за убеждението ми, че тя е нейно лично дело.

- **Критични бележки и въпроси.** Нямам такива.

- **Публикувани статии и цитирания.** Преценка на публикациите по дисертационния труд. Отражение в науката – използване и цитиране от други автори.

Приложеният списък на публикациите, свързани с дисертацията, включва три заглавия, описани в последния раздел на дисертационния труд. Те са на английски език, като в една тях ас. Росица Милева е самостоятелен автор и е на водеща в останалите, както и в двете участия с доклади на английски език на международни научни конференции. Две от статиите са публикувани в списание с импакт фактор (Bulgarian Journal of Veterinary Medicine) и една – в списание с импакт ранг (Scopus) - Macedonian Veterinary Review. **Тези научни публикации са достатъчни за защита на дисертационния труд.** Има данни за цитиране на една от публикациите от чуждестранни автори. Допълнително в представената справка от Централната библиотека на Тракийския университет има информация за участие на ас. Росица Милева като водещ автор в други две публикации в периодични издания, индексирани в Web of Sciences и с импакт ранг (Scopus). Тя има участие и в изготвянето на учебно ръководство за студенти „Фармацевтични форми за ветеринарна медицина с рецептура” (Ст.Загора, 2018). От тези данни личи, че тя е изграден учен, който може да работи на високо ниво както самостоятелно, така и в екип, с активна научноизследователска и публикационна дейност.

- **Авторефератът** е написан на 47 страници и включва необходимите раздели съгласно общоприетите изисквания. Резултатите в него са онагледени с **15 таблици и 9 фигури**, които ясно представят извършените изследвания. Авторефератът е добре оформен естетически и отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

В заключение изказвам убеждението си, че ас. Росица Милева е добре подготвен и изграден перспективен млад специалист със задълбочена теоретична и практическа подготовка по научната специалност, владеещ най-съвременни методи на изследване и умения да обработва, сравнява и тълкува получените резултати. **Представеният от нея дисертационен труд отговаря на критериите и показателите за придобиване на ОНС „Доктор”, заложен в ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и Вътрешния правилник за развитие на академичния състав в Тракийския университет в гр. Стара Загора.** Той е достатъчен по обем, добре конструиран, изпълнен е на високо ниво и написан на академичен език. Темата е актуална. Литературната осведоменост на автора е много добра, както и умението му да ползва литературната информация в творческата си дейност. Изследванията са извършени на високо съвременно ниво, а получените резултати са представени и анализирани ясно и компетентно. От тях произхождат полезни за практиката приноси. От изработката, написването, отразяването и тълкуването на резултатите в дисертацията личи високата компетентност на автора. Тя е видна и от статиите, публикувани в списания с импакт фактор и импакт ранг, както и от цитирането от чуждестранни учени.

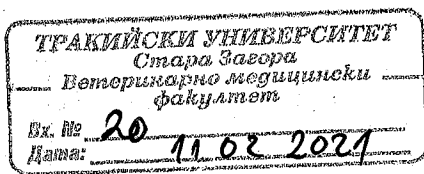
Всичко това ми дава основание да дам своя положителен вот и да предложа на уважаемите членове на Научното жури също да гласуват **положително** за придобиване от асистент Росица Живкова Милева на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност “Фармакология” в област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

05.02.2021 г.

гр. София

Изготвил:

(проф. д-р Т. Попова, д-р)



OPINION

about a dissertation for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Pharmacology", field of higher education 6.0 Agricultural sciences and veterinary medicine, professional area 6.4. Veterinary Medicine.

Author of the dissertation: Assistant prof. Rositsa Zhivkova Mileva, Traka University, Stara Zagora

Dissertation topic: "Pharmacokinetics of doxycycline and population modeling in mammals"

Opinion prepared by: prof. Teodora Petrova Popova, DVM, DSc, University of Forestry, city of Sofia, field of higher education "Agrarian sciences and veterinary medicine", professional area 6.4. "Veterinary medicine", scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of contagious diseases in animals", appointed as member of the Scientific jury by Order No.3363/17.12.2020 of the Rector of Trakia University in Stara Zagora.

• **Brief introduction of the candidate.**

Rositsa Zhivkova Mileva graduated from the Trakia University in St. Zagora at the end of 2012 as a Master of Veterinary Medicine. In 2011 she has completed three-month training in Hanover, Germany as a student in the ERASMUS program. Her work experience in the specialty began in 2013 in a veterinary clinic for small animals in Stara Zagora. From 14.07.2017 until now she is an Assistant professor in the Section of Pharmacology, Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry in VMF in Trakia University. During this period Rositsa Mileva has undergone a number of additional trainings such as a course in "Medical English", "Statistical software for data processing - basic methods", "Protection and welfare of experimental animals used for scientific or educational purposes", training for work with liquid chromatographic system with mass spectrometer LC / MS-MS and specialization at the University of Utrecht in "Population modeling and cell cultivation". She has participated in a workshop and three webinars on topics related to modern laboratory methods. Rositsa Mileva is enrolled in a doctoral program in an independent form of education with Order of the Rector of TrU № 2645 / 01.10.2019, with scientific supervisor Prof. Anelia Milanova Kondeva. She has fulfilled the individual curriculum of the doctoral program, has successfully passed exams in the specialty and by Order of the Rector of TrU № 2809 / 26.10.2020 has been deducted with the right to defense.

• **General characteristics and structure of the dissertation.**

The dissertation is written on 145 standard pages. It includes the necessary sections according to the generally accepted requirements. The abbreviations used are described after the content on one page. Following is the introduction, which covers 2 pages, the literature review is presented on 32 pages, the purpose and tasks - on 1 page, the materials and methods used - on 20 pages, the results are reflected on 28 pages, the discussion - on 30 pages with a generalization - 4 pages, the conclusions are 6 in number, presented on 1 ½ page, the literature index covers 18 pages, the contributions are 7 in number, written on 1 page, and the publications in connection with the dissertation, participation in scientific forums and projects are presented on the last page. **The dissertation is structured correctly and appropriately, with an adequate ratio between the sections.**

• **Relevance of the problem.**

The topic of the presented dissertation is especially **relevant** in the context of the global spread of multidrug-resistant microbial strains and the increasingly limited possibilities for

choosing effective means for the treatment of infections. A particularly important prerequisite for successful treatment is their precise dosing. In order to ensure safe food, the tendency to limit the use of antibiotics in productive animals is a challenge for veterinary medicine. The free choice of antimicrobials for use in these animals is increasingly limited and difficult. This requires an in-depth study of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics from the main groups used in veterinary medicine, which include and tetracyclines. In this aspect, it is essential to refine their dosage, for which it is important to study their free plasma concentrations, as well as to individualize their use even when it comes to large groups of animals. Data on the population pharmacokinetics of antibiotics in a number of animal species are essential to investigate the possibilities for optimizing their dose regimen. Doxycycline is a broad-spectrum antibiotic that has been used successfully to treat bacterial and protozoan diseases in a number of animal species. Its pharmacokinetics in relation to significant sources of variability is not well characterized in some species such as small ruminants, rabbits and others. Its study would contribute to the refinement and individualization of antibiotic therapy in farm animals, which is particularly important in reducing the risk of selection of resistant microbial strains in farms and their spread in the environment and along the food chain.

The topic of the presented dissertation arises from these problems, the purpose of which is to accurately characterize the behaviour of the antibiotic doxycycline in small ruminants and rabbits for which there is limited information, through population modeling and markers as clinical and biochemical indicators. This is important to better know the sources of variation between treated animals and to refine the use of this widely used antibiotic.

• **Degree of knowledge of the state of the problem and creative interpretation of the literature review.**

The introduction to the dissertation presents the topic clearly and groundedly, showing in-depth knowledge of the problem. In **the literature review**, the challenges to veterinary medicine in antimicrobial therapy are very well highlighted. A characteristic of the antibiotic doxycycline is given, its pharmacodynamics and pharmacokinetics are presented, including the sustained release forms. Also of interest are the presented data on pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and population methods for pharmacokinetic analysis to optimize therapy with this antibiotic in animals. Methods for determination of doxycycline in biological tissues and fluids are considered. Many of the literature data are presented in the form of tables (6 in number), which I consider an appropriate and effective approach. **In the summary** of the literature, it is pointed out that the pharmacokinetics of doxycycline have been well studied in a number of mammals, but insufficiently in lactating animals, small ruminants and rabbits. The pharmacodynamic characteristics of doxycycline make it useful for the control of infections specific to small ruminants and rabbits, which requires a good knowledge of its pharmacokinetics. The author did not find in the literature information on population pharmacokinetic analysis of this antibiotic in small ruminants and rabbits. However, the experimental receiving of such data is necessary to specify the use of doxycycline and its dosing regimen, which is a prerequisite for determining the purpose of the dissertation. **The literature review has been prepared and structured appropriately.**

• **Purpose, tasks, hypotheses and research methods. Correspondence of the chosen research methodology with the set goal and tasks of the dissertation.**

The purpose of the dissertation is clearly and correctly formulated. It envisages a study of the pharmacokinetics of doxycycline in small ruminants and rabbits, with pharmacokinetic modeling correlated with clinical and biochemical parameters using population pharmacokinetic analysis methods. **The tasks are five in number, clearly delineated. They are appropriate and sufficient to achieve the purpose of the research.**

In the section "**Materials and methods**", the experimental animals used (38 in number, sheep, lambs, rabbits and pigs), the composition of their ration (clearly presented in three tables), drugs and reagents are clearly described. The experiments are conducted in accordance with Ordinance №20 / 01.11.2012 of the Bulgarian legislation on the minimum requirements for protection and welfare of experimental animals and the requirements for sites for use, breeding and / or delivery. The experimental procedures and the applied research methods (for performing the necessary analyzes, for determining clinical biochemical parameters and pharmacokinetic analysis), their validation for determination of doxycycline in biological materials, calculation and comparison of the obtained results are comprehensively described. The presentation of the data in this section shows the excellent knowledge of the applied modern research methods such as high performance liquid chromatography, etc., which are fully suitable for successful performance of the tasks. The results have been processed statistically. **The selected research methods fully correspond to the aim and tasks of the dissertation.**

• **Visualization and presentation of the obtained results.**

The results of the performed research **fully correspond to the set tasks**. They are **presented clearly and perspicuous** in the appropriate sequence. The data are very well systematized and presented in the section "Results", as they are summarized and reflected in **17 tables** (they are a total of 26, but 9 of them are in the previous sections) and **15 figures**, of which can be clearly seen and compared the data obtained. The tables and figures are very well formed. The text to them in the section perfectly emphasizes and complements the presented data. It shows that the author mastered in detail the most modern methods applied, their appropriate use, as well as the processing and analysis of the results. The experiments have been performed and readed accurately, and the results have been processed and analyzed in-depth and appropriately.

This section of the dissertation fully presents all the data obtained from the research, which shows the high competence of the author and his ability to apply the mastered laboratory research methods and specialized software, as well as to summarize, present and compare the results. They show that **the tasks have been completed, which ensures the achievement of the aim.**

• **Discussion of the results and used literature.**

The section "Discussion" contains a detailed and in-depth analysis, interpretation and comparison of the results, evaluation of the applied methods and their possibilities for future use not only for research but also for practical purposes. The section is structured in accordance with the set tasks. It also shows the high competence of the author and his ability to interpret and compare the results. The discussion is thorough and complete. The in-depth preparation and high awareness of the author in the field of research stands out here again, as well as knowledge of the literature on the subject. She presents herself as a competent and promising specialist in the scientific field, mastering modern methods of data research and analysis, with a creative approach to information, as well as with a high style of data presentation. **The summary** is also very well presented, which outlines the advantages of the used validated sensitive methods for analysis and research models, as well as perspectives for their future application.

The author has formulated **six conclusions**, which clearly and synthesized reflect the most important of the results obtained in the sequence of tasks.

The literature index comprises 202 sources and shows the author's good awareness of the state of the problem, mainly abroad. Only one of them is in Cyrillic. Four of the sources are of Bulgarian authors, and this small number is probably due to the fact that we do not have enough research on the topic and further shows the relevance of the problem. The share of sources from the last 10 years is the highest - over 36%, which is an indication of good information of the author at a contemporary level. At least (11%) are the sources from before 2000. The literary index is perfectly formed according to the standard requirements.

- **Contributions of the dissertation.**

The contributions resulting from the performed research and analysis are a total of 7. They are clearly and synthesized formulated. **All are original**, two of which are of applied nature. As a result of the studies performed, the pharmacokinetics of orally administered doxycycline are described for the first time by classical methods for pharmacokinetic analysis in lambs compared to adult sheeps. Relatively slow resorption and a tendency to rapid elimination have been found. High concentrations of the antibiotic have been found in the milk of lactating sheep. In similar studies in adolescent and adult rabbits, no differences have been found between the selected age groups. The created for the first time population pharmacokinetic models to characterize the behavior of doxycycline in sheep and rabbits are an important contribution. The influence of age and related differences in body weight, digestive tract development and liver function on the pharmacokinetics of orally administered doxycycline have been established using a model developed based on sheep data. Also, the population pharmacokinetic model developed based on rabbit data reveals the correlation of some biochemical parameters such as albumin and ALT with key pharmacokinetic parameters of doxycycline such as clearance and volume of distribution. The developed and validated method by high performance liquid chromatography with PDA detection of doxycycline in plasma of sheep, rabbits, pigs and sheep's milk, which can be used in future pharmacokinetic studies, is of an applied nature. Filtration through microfilters makes it possible to determine the free concentrations of doxycycline. The sheep and rabbit database created as a result of the studies is the basis for future pharmacokinetic studies and refinement of dose regimens using population pharmacokinetic modeling.

Recommendations for the practice are not presented. I think so formulating such recommendations would be useful.

- **Assessment of the degree of personal participation of the dissertation author in the contributions.**

In the publications and in the dissertation work, the active participation and the significant personal contribution of the assistant professor Rositsa Mileva is clearly outlined. She is the only author of one of the presented scientific articles and leading author of the other two, as well as in both participations with reports in English at international scientific conferences, one of which has been virtual. She has been the leader of the research project NP 07/2018 on the topic "Validation of a method for determination of tetracyclines in serum of sheep / goats / rabbits", related to the topic of the dissertation. She also participated in the University Research Project №01/2020. "Studies on the sorption of doxycycline on feed depending on pH". All this, as well as the high competence and precision of the presentation of all sections of the dissertation gives grounds for my conviction that **it is her personal work**.

- **Critical remarks and questions.**

I don't have such.

- **Published articles and citations. Evaluation of dissertation publications. Reflection in science - use and citation by other authors.**

The presented list of publications related to the dissertation includes three titles described in the last section of the dissertation. They are in English, and in one of them Assistant Professor Rositsa Mileva is an independent author and is a presenter in the others, as well as in both participations with reports in English at international scientific conferences. Two of the articles are published in a journal with an Impact Factor (Bulgarian Journal of Veterinary Medicine) and one is in an Impact rank journal (Scopus) - Macedonian Veterinary Review. **These scientific publications are sufficient to defend the dissertation**. There is **citation data** of one of the publications by foreign authors. Additionally, the reference presented by the Central Library of


the Trakia University contains information about the participation of Assistant Professor Rositsa Mileva as a leading author in two other publications in periodicals, indexed in the Web of Sciences and with impact rank (Scopus). She also has a participation in the preparation of a textbook for students "Pharmaceutical forms for veterinary medicine with a prescription" (St. Zagora, 2018). From these data it is clear that she is a built scientist who can work at a high level both individually and in a team, with high research and publication activity.

• **The dissertation abstract** is written on 47 pages and includes the necessary sections according to the generally accepted requirements. The results in it are illustrated with **15 tables** and **9 figures**, which clearly present the research performed. **The abstract is well formed aesthetically and objectively reflects the structure and content of the dissertation.**

In conclusion, I express my conviction that Assistant Professor Rositsa Mileva is a well-prepared and reliable young specialist with in-depth theoretical and practical training in the scientific specialty, mastering the most modern research methods and skills to process, compare and interpret the results. **The dissertation presented by her fully meets the criteria and indicators for acquiring the educational and scientific degree "Doctor" set in the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Rules for its implementation and the Rules for development of academic staff at Trakia University in Stara Zagora.** It is sufficient in volume, well constructed, executed at a high level and written in academic language. The topic is current. The author's literary awareness is very good, as well as her ability to use literary information in her creative work. The research has been carried out at a high modern level, and the results obtained are presented and analyzed clearly and competently. Useful contributions for practice originate from them. The high competence of the author is evident from the elaboration, writing, reflection and interpretation of the results in the dissertation. It is also evident from the articles published in journals with impact factor and impact rank, as well as from citation by foreign scientists.

All this provides me a reason to give my positive vote and to propose to the esteemed members of the Scientific Jury to also vote positively for the **acquisition by Assistant Professor Rositsa Zhivkova Mileva of the educational and scientific degree "Doctor" in "Pharmacology"** in field of higher education 6.0 Agricultural sciences and veterinary medicine, professional area 6.4. Veterinary Medicine.

05 February 2021
City of Sofia

Opinion prepared by: 
(prof. T. Popova, DSc)