

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

„Фармакокинетика на доксициклин и популационно моделиране при бозайници“

на редовен докторант д-р Росица Живкова Милева – магистър по ветеринарна медицина от „Катедрата по фармакология, физиология на животните и физиологична химия“ при Ветеринарно-Медицински факултет на Тракийски университет – Стара Загора, за получаване на образователната и научна степен „Доктор“

от проф. д-р Дамянка Петева Гетова-Спасова, д.м.н.
член на научно жури назначено със заповед №3363 от 17.12.2020г
на Ректора на Тракийски университет гр. Стара Загора

Кратки биографични данни за кандидатката: Д-р Росица Живкова Милева се дипломира като магистър ветеринарен лекар във Ветеринарно-медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора през 2013г. До 2017г работи във Ветеринарна амбулатория за дребни животни в гр. Стара Загора. От м. юли 2017 е редовен асистент в секция „Фармакология“ при Катедра по фармакология, физиология на животните и физиологична химия, на Ветеринарния факултет на Тракийски университет в гр. Стара Загора. До момента има участие като съавтор в 5 научни статии.

Рецензията дисертационен труд се състои от 145 страници и е конструиран по класическата схема – Увод 3 стр, Литературен обзор 32 стр, Цел и задачи – 1 стр, Материал и методи – 20 стр, Резултати – 29 стр, Обсъждане – 28 стр, Обобщение 5 стр, Изводи – 6 и Приноси – с оригинален характер 5 и с приложен характер 2.

Цитирана литература от 201 източника, от тях 1 на български език и останалите на английски език.

Уводът очертава актуалността на дисертационния труд, предвид необходимостта ветеринарните лекари да се справят с разумната употреба на антибиотици, проявите на резистентност към тях и правилния режим на дозирането им. Популационните методи за фармакокинетичен анализ позволяват характеризиране на вариабилността в популацията и дават възможност за прецизиране на фармакотерапията с тетрациклини, което е основната цел на предложения дисертационен труд.

Обзорът е написан компетентно, с добро познаване на същността на проблема. При масовото третиране на животните във фермите с антибиотици се наблюдават значими интериндивидуални различия във фармакокинетиката им. Различия има и в поведението, възрастта и индивидуалния прием на храна и вода. Популационния метод позволява характеристика на вариабилността в популацията при прием на антибиотици. Личи критичното отношение на д-р Милева към намерените данни и ясно очертаване на актуалността на избраната тема. В световен мащаб има единични проучвания, в които фармакокинетиката на антибиотици се обвързва с маркери, характеризиращи фармакологичния отговор, което е значително предимство на дисертационния труд. Високо оценявам способността на дисертанта да работи със специализираната литература по разработвания проблем.

Нямам критични бележки по същността на обзора. Предварително направените препоръки за леки промени в структурата на обзора са изцяло приети от докторанта и коригирани.

От направеният преглед на литературата произтичат съвсем логично **целта и задачите** на дисертационния труд, които са много добре формулирани. С помощта на популационното моделиране и маркери като клинични и параклинични показатели се цели подробното охарактеризиране на доксициклин, широко употребяван във ветеринарно-медицинската практика. За постигане на целта на проучването са формулирани 5 задачи.

Методичната част е богата и показва високата професионална подготовка на дисертанта. Експериментите са проведени върху зайци, овце и агнета и свине.

Експерименталният дизайн е акуратно описан. Използвани са съвременни аналитични методи като HPLC за определяне на концентрациите на доксициклин в плазма и мляко. Методът е валидиран, като са определени праг на детекция и праг на количествено определяне, възстановимост, точност и акуратност и специфичност. Методът позволява обработката на голям брой проби за кратък период от време, поради бързата и лесната им подготовка и поради краткото време за задържане на доксициклина в HPLC колонката. Направеното изчисление за среден процент за корекция на определените концентрации поради свързване с плазмените протеини може да послужи при бъдещи фармакокинетични изследвания.

Определяни са множество клинични биохимични параметри. Фармакокинетични анализи като некомпартиментен, еднокомпартиментен и популационен са извършени на съвременно научно ниво. Използването на популационен фармакокинетичен анализ е успешно избран метод предвид факта, че некомпартиментния фармакокинетичен анализ е неадекватен при лекарства с дълъг полуживот на елиминиране. Особено важен показател е определянето на средното време за задържане в организма на доксициклина.

Статистическата обработка на получените биохимични резултати и фармакокинетични параметри е направена с компютърни програми с високи нива на достоверност.

Собствените експериментални резултати са представени изключително съвестно, богато илюстрирани със 14 фигури и 17 таблици. При описването на резултатите личи компетентността на дисертанта и личното му участие в планирането, провеждането и анализирането на експериментите. Собствените данни са точно и акуратно описани, съответстващо на илюстрационния материал.

Значително предимство на разработеният HPLC метод е предназначението му за бъдещи фармакокинетични проучвания с цел прецизиране на режимите на дозиране на доксициклин. Той позволява детекция на доксициклин в плазма и мляко от овце, както и в плазма от зайци и свине. Резултатите за акуратност, точност и възстановимост покриват нужните критерии според Европейската агенция по лекарствата и са средно над 90%. Ограниченията на метода са свързани с диапазона

на линейност на стандартната крива при плазма от зайци. Фармакокинетичните проучвания при зайци показват, че максималните плазмени концентрации зависят от лекарствената форма: разтвор на доксициклинов хиклат или суспензия в микрокапсули.

Практическо предимство е факта, че анализите се осъществяват за кратко време и не се изискват вложенията на скъпи консумативи. Допълнително предимство на метода е използването на вътрешен стандарт, което намалява лабораторната грешка при екстракция на пробите. Проверка за наличието на доксициклин в мляко от овце и плазма от овце, зайци и свине може да бъде направена бързо и чрез тестване на единични проби, в случаите на популационен фармакокинетичен анализ.

Обсъждането е направено стегнато и компетентно. Собствените експериментални резултати са интерпретирани в светлината на съвременните данни от литературата по въпроса. Личи способността и израстването на д-р Милева като млад учен да представи своите данни сравнително с известните от литературата.

В достъпната литература няма налични данни, описващи фармакокинетиката на доксициклина след перорално приложение при подрастващи преживни животни с незряла функция на румена. Поради това резултатите от агнетата не могат да бъдат сравнени с данните от други проучвания при агнета или козлета, което прави приносът на това изследване особено значим.

При обработката на данните от експериментите с овце и зайци, дисертантката успешно използва още едно от предимствата на популационния анализ: включването в изчисленията на измерени концентрации под прага на количествено определяне. Въпреки, че все още голяма част от фармакокинетичните проучвания във ветеринарната медицина не докладват наличието на такива данни или начина на обработката им, оптимизирането на резултатите от този популационен анализ очертава също принос на дисертационния труд.

Умело направеното **обобщение** в края на обсъждането показва способността на авторката да направи заключения от собствените си експериментални данни и води логично до формиране на изводите на дисертационния труд.

Изводи и приноси - представени са 6 извода, които отговарят на получените резултати. Формулирани са и оригинални приноси – 5 с научен характер и 2 с приложен. Изводите и приносите са точно формулирани.

Научна продукция свързана с дисертацията

Д-р Милева има публикувани 3 научни статии, свързани с дисертационния труд, от които 1 е с обзорен характер. Отбелязано е и 1 цитиране на статия от чуждестранни учени. Дисертантката е участвала с 1 научно съобщение на научна конференция с международно участие. Тя е ръководител на 1 младежки научен проект и участва и в разработването на 2-ри вътре-университетски научен проект.

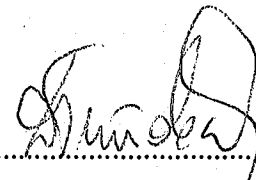
Авторефератът напълно съответства на предложения дисертационен труд и нямам забележки към него. Добро впечатление прави резюмето на английски език в автореферата, което спомага за по-голямото популяризиране на този труд.

Краино становище: Дисертационният труд съдържа теоретични и практически обобщения, касаещи популационното фармакокинетично изследване на антибиотика доксициклин при овце, агнета, зайци и свине. Доказана е необходимостта от използването на популационното моделиране и изследването на биохимични показатели за по-доброто познаване на източниците за вариации на доксациклина и прецизиране на неговата употреба във ветеринарната медицина. Повечето от получените резултати са оригинални и имат приносен характер. Формулираните изводи и приноси отразяват високата стойност на дисертацията.

Убедено препоръчвам на членовете на научното жури да гласуват положително и дадат ход за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ за дисертационния труд на д-р Росица Живкова Милева.

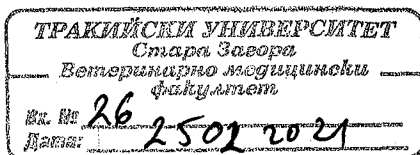
17.02.2021г

София



.....

Проф. Д-р Д. Гетова-Спасова, дмн.



REVIEW

of PhD thesis on:

„Pharmacokinetic of doxycycline and population modelling in mammals”

of full-time PhD student **Rositza Zhivkova Mileva**, DVM – Master’s degree in
Veterinary Medicine,
Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry,
Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora
For acquisition of PhD educational and scientific degree

Made by Professor **Damianka Peteva Getova-Spasova**, MD, PhD, DrSci.
Member of scientific jury appointed by order No.3363 dated 17 Dec 2020 by the Rector of
Trakia University, Stara Zagora

Brief biographical data about the candidate: Dr. **Rositza Zhivkova Mileva** obtained Master’s degree of Veterinary Medicine at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora in 2013. Till 2017 she worked at Veterinary Outpatient Clinic for small animals in Stara Zagora. Since July 2017 she has been a full-time Assistant Professor at the Division of “Pharmacology” at the Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry at the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora. At present she is coauthor of 5 scientific papers

The PhD thesis under review is written on 145 pages and is structured according to a classical layout - Introduction - 3 pages, Literature review - 32 pages, Objective and Tasks – 1 page, Material and Methods – 20 pages, Results – 29 pages, Discussion – 28 pages, Summary – 5 pages, Conclusion – 6 and Contributions – 5 of original nature and 2 of applied nature. The literature cited comprises 201 sources, of which 1 in Bulgarian and the rest in English.

The **Introduction** emphasizes on relevance of the PhD thesis, taking into account the need for veterinary doctors to make rational usage of antibiotics, the manifestations of resistance to them and their correct dosage. The population methods of pharmacokinetic analysis permit characterization of the population variability and provide an opportunity for refinement of pharmacotherapy with tetracyclines, which is the main objective of the PhD thesis.

The **Literature review** is written competently with good knowledge of the essence of the issue. With large-scale antibiotic treatment of farm animals there are significant inter-individual differences observed in their pharmacokinetics. There are differences in the behaviour, age and individual food and water intake. The population method allows for characterization of variability in the population during antibiotic treatment. Dr. Mileva's critical attitude to the data found is evident along with clear outlining of the relevance of the topic selected. Worldwide, there are single studies in which the pharmacokinetics of antibiotics is associated with markers characterizing the pharmacological response, which I consider a considerable advantage of the PhD thesis. I evaluate highly the ability of the PhD student to work with specialized literature on the studied issue.

I have no critical remarks on the content of the review. The preliminary recommendations I had made for slight changes in the structure of the review were entirely accepted and corrected by the PhD student.

From the literature review quite logical are the **objective and the tasks** of the PhD thesis, which are very well formulated. By means of population modeling and markers for clinical and para-clinical indicators the aim is to characterize in detail doxycycline, widely used in veterinary practice. To achieve the objective of the study 5 tasks have been formulated.

The **Methods** part is abounding and shows the high professional background of the PhD student. The experiments are on rabbits, sheep, lambs and swine. The experimental design is accurately described. Modern analytical methods have been used such as HPLC to determine doxycycline concentrations in plasma and milk. The method is validated and threshold of detection and threshold for quantitative determination, recoverability, accuracy and specificity have been determined. This method allows the processing of a

great number of samples for a short period of time, due to their fast and easy preparation and due to the short time of doxycycline detention in the HPLC column. The calculation made for average percentage of correction of the determined concentrations due to binding to plasma proteins may be used in future pharmacokinetic studies.

A number of clinical biochemical parameters have been determined. Pharmacokinetic analyses such as non-compartmental, one-compartmental and populational have been made on modern scientific level. The use of population pharmacokinetic analysis is a successfully chosen method in view of the fact that non-compartmental pharmacokinetic analysis is not appropriate for drugs with long half-life of elimination. Especially important parameter is the determination of average time for doxycycline detention in the body.

Statistical processing of the obtained biochemical results and pharmacokinetic parameters is done using computer software with high level of reliability.

Own experimental results are presented extremely conscientiously, richly illustrated with 14 figures and 17 tables. In describing the results the competency of the PhD student and her own participation in planning, conducting and analyzing the experiments is evident. The own data are accurately described, corresponding to the illustration material.

Significant advantage of the HPLC method developed is its use in for future pharmacokinetic studies aiming to precise the dosage of doxycycline. It allows detection of doxycycline in plasma and milk of sheep, as well as in plasma of rabbits and swine. The accuracy, precision and recoverability results comply with the necessary criteria according to the European Medicinal Agency and are above 90% on average. The limitation of the method is related to the linearity range of the standard curve for rabbit plasma. The pharmacokinetic studies on rabbits revealed that maximum plasma concentrations depended on the drug formulation: doxycycline hyclate solution or suspension in microcapsules.

Practical advantage is the fact that analyses are done for short time and do not require the use of expensive consumables. An additional advantage of the method is the use of an internal standard, which decrease the laboratory error in sample extraction. The

check for presence of doxycycline in sheep milk and sheep, rabbit and swine plasma can be done fast by testing single samples in the cases of population pharmacokinetic analysis.

The **Discussion** is concise and competent. The own experimental results have been interpreted within the light of modern data in literature on the matter. The ability and growth of Dr. Mileva as a young scientist to present her own data comparatively with those known in literature is evident.

In the available literature there are no data describing doxycycline pharmacokinetics after oral administration in adolescent ruminants with immature rumen function. Thus, the results from lambs cannot be compared with those from other studies on lambs or kids, which makes the contribution of this study especially significant.

In processing the experimental data from sheep and rabbits, the PhD student successfully used another advantage of population analysis: including in the calculations measured concentrations which are below the quantitative threshold of determination. Although a great number of pharmacokinetic studies in veterinary medicine do not yet report the presence of such data or the method of their processing, the optimization of results from this population analysis emphasizes another contribution of the PhD thesis.

The skillful **summary** at the end of the discussion shows the author's ability to make conclusions from her own experimental data and leads to logical formation of conclusions from the PhD thesis.

Conclusions and contributions – a total of 6 conclusions have been presented that comply with results obtained. Original contributions have been formulated, 5 of them of scientific nature and 2 of practical character. Conclusions and contributions have been precisely formulated.

Scientific production related to the PhD thesis

Dr. Mileva has 3 published scientific articles related to the PhD thesis, 1 of them in the form a review. There is 1 citation of her paper made by foreign authors. The PhD student has participated with 1 scientific communication at a scientific conference with international participation. She is the leader of 1 scientific project for young scientists and takes part in a 2nd interuniversity scientific project.

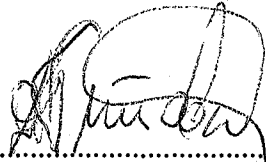
The self-abstract completely corresponds to the offered PhD thesis and I have no remarks on it. Very good impression is made by the short abstract in English in the self-abstract, which contributes to the dissemination of this work.

Final opinion: The PhD thesis contains both theoretical and practical conclusions, concerning population pharmacokinetic study of the antibiotic doxycycline in sheep, lambs, rabbits and swine. The necessity to use population modeling and the study of biochemical indicators for better knowledge of the variation sources of doxycycline and making more precise use of it in veterinary medicine have been proven. Most of the results obtained are original and are regarded as contributions. The formulated brief conclusions and contributions reflect the high value of the PhD thesis.

I convincingly recommend to the members of the scientific jury to vote positively and give the way for awarding the PhD educational and scientific degree for the PhD thesis of Dr. Rositsa Zhivkova Mileva.

10 Feb 2021

Sofia



.....

Prof. Damianka Getova-Spasova, MD, PhD, DrSci.