

СТАНОВИЩЕ

на дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 6.0. „Аграрни науки и ветеринарна медицина”, в професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина” по докторска програма „Фармакология”.

Автор на дисертационния труд: ас. Росица Живкова Милева – докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Фармакология, физиология на животните и физиологична химия” при Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Тема на дисертационния труд за присъждане на ОНС „Доктор”: „Фармакокинетика на доксициклин и популационно моделиране при бозайници”.

Изготвил научното становище: професор Д-р Димитричка Йорданова Димитрова от Факултета по ветеринарна медицина при Лесотехнически университет – гр. София, област на висше образование 6.0. „Аграрни науки и ветеринарна медицина”, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина”, определена за член на Научно жури със заповед № 3363/17.12.2020 г. на Ректора на Тракийски университет – гр. Стара Загора и решение на Научното жури (Протокол № 1/22.12.2020 г.).

1. Кратко представяне на докторантката

Асистент Росица Живкова Милева е родена в гр. Раднево, област Стара Загора на 17 август 1988 година. Своето висше образование докторантката получава във Ветеринарномедицински факултет, където през 2013 г. получава образователна степен „Магистър ветеринарен лекар”. Нейният трудов стаж като асистент започва от 14.07.2017 г. в Катедра „Фармакология”, физиология на животните и физиологична химия” при ВМФ, където и понастоящем е преподавател. Докторантката владее английски език, което е видно от приложената към документите автобиография, което и позволява да борави свободно с научната литература имаща отношение към темата на дисертацията.

За решаване на поставените цели и задачи по дисертацията ас. Милева е усвоила за много кратко време редица методики и програми за работа с течно-хроматографска система с мас спектрометър LC/MS-MS; за популационно фармакокинетично моделиране; за обработка на научни данни със специализиран статистически софтуер.

Докторантката е представила в срок, в принтиран и електронен вариант своя дисертационен труд, автореферата към него, както и всички изискуеми документи свързани с откритата процедура за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

По време на докторантурата в Катедрата по фармакология, физиология на животните и физиологична химия Росица Милева провежда и практически упражнения по фармакология. Видно е, че тя притежава добри комуникативни и организационни умения, придобити в преподавателската и дейност със студентите.

2. Актуалност на проблема

Нарастването на антимикробната резистентност представлява световен и основен проблем в хуманната и ветеринарната медицина. Въпреки че бяха предложени няколко стратегии за преодоляване и контролиране на антимикробната резистентност все още този проблем не е решен. Отговорност на ветеринарните и хуманните лекари е те да стопират нарастващата резистентност на патогенните микроорганизми чрез прилагане на правилен режим на дозиране на използваните антибактериални лекарствени продукти. Това налага добро познаване на фармакокинетиката и фармакодинамиката на прилаганите антимикробни лекарства в терапията на бактериалните инфекции при животни и хора. За разлика от хуманната медицина, в условията на съвременното промишлено животновъдство много често ветеринарният лекар е принуден да ги използва за масово третиране на болните животни, а не само за индивидуална терапия. При масовата терапия на пациенти от един и същи животински вид, много често се установяват значими интериндивидуални различия във фармакокинетичното „поведение” на използвания лекарствен продукт. За разлика от класическия компартиментен и некомпартиментен фармакокинетичен анализ, популационната фармакокинетика позволява да се проследи и характеризира вариабилността в популацията животни.

В настоящият дисертационен труд се проучва фармакокинетиката на тетрациклиновия антибиотик – доксициклин след вътрешно въвеждане при дребни преживни – овце и агнета, като и при други продуктивни животни – при подрастващи и полово зрели зайци.

Представеният ми дисертационен труд е написан на 145 страници, формат А4, Той съдържа всички части, които трябва да има един дисертационен труд, а именно: Въведение – 2,5 стр.; Литературен обзор – 32 стр.; Собствени изследвания, подразделени на: Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 21 стр., Резултати – 27 стр., Обсъждане – 29 страници. Разделите „Обобщение”, „Изводи” и „Литературен указател” са съответно 3, 2 и 23 страници. Справката за приносите на дисертационния труд е 1 страница. В края на дисертационния труд са поместени следните раздели: Научни публикации във връзка с дисертацията и Доклади пред научни конференции във връзка с дисертационния труд.

Всички съдържащи се раздели са в хармонични съотношения.

Научната разработка има за цел да представи резултатите от проведените фармакокинетични изследвания на доксациклин при различни видове бозайници – дребни

преживни и зайци. Разработваната дисертация е актуална, с висока степен на стопанска и здравна значимост.

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

Литературният обзор е съставен въз основа на 201 литературни източника (1 на кирилица и 200 на латиница). Литературните източници за последните 10 години (за периода 2010-2020 г.) са 115 броя и съставляват 57,21 % от всички използвани в дисертацията, като от тях 86 са от последните 5 години (период 2015-2020 г.), съставляващи 20,90 % от цялата литература използвана за написването на литературния обзор.

В Литературният преглед са сформирани 6 основни раздела, като в първия от тях са включени данни относно антибиотикотерапията във ветеринарната медицина и резистентността на патогенните микроорганизми спрямо използваните антибактериални лекарствени продукти.

Във вторият раздел на Литературния обзор са включени данни относно химичната структура и физическите особености на използвания в дисертацията тетрациклинов антибиотик. В него има и информация за механизма на действие, за режима на дозиране и за използваните дозировки при продуктивни животни и домашни любимци. Тук докторантката е включила и публикации, които предоставят изобилие от информация свързана със страничните ефекти, наблюдавани след употребата на доксициклин, информация за средната летална доза (DL_{50}) при лабораторни животни, определена след вътрешен прием на антибиотика.

В трети раздел на Литературния обзор докторантката предоставя подробна информация за фармакодинамиката на използвания в дисертацията антибиотик. В този раздел са включени Минималната инхибираща концентрация (MIC) спрямо ралични патогенни микроорганизми. Предоставена е и информация, свързана с основните механизми чрез които патогенните микроорганизми изграждат резистентност спрямо използвания тетрациклинов антибиотик.

В четвърти раздел от Литературния обзор е включена информация свързана с фармакокинетиката на използвания антибиотик след различни начини на прилагане при продуктивни животни и такива, отглеждани за компания. В този раздел подробно се разглежда резорбцията, разпределението, метаболизма и елиминирането на антибиотика след вътрешен прием при различни видове животни. Обособен е отделен подраздел, в който докторантката разглежда фармакокинетиката, в случаите когато доксициклинът е използван като дълго-действащи (long-acting) лекарствени форми за перорално и инжективно прилагане.

Пети раздел от Литературния обзор е обособен от публикации свързани с фармакокинетичното-фармакодинамичното моделиране, с цел оптимизиране на терапията с използвания в дисертацията антибиотик при болни животни. В този раздел на литературната справка е отредено място за т.нар. „Популационна фармакокинетика”, предоставяйки информация за приложението на популационните методи за фармакокинетичен анализ за оптимизиране на терапията с използвания тетрациклинов антибиотик.

Последният (VI^{ти}) раздел от Литературния обзор е отреден за подробно описание на микробиологичните и апаратни методи за определяне на доксициклин в биологични продукти – кръвен серум, кръвна плазма и мляко.

В този си вид макроструктурата на Литературния преглед е в съответствие с научните цели и задачи на дисертацията. Бих могла да кажа, че е постигната пълнота от гледна точка на вида и задачите на дисертационния труд.

В своята цялост Литературният обзор показва задълбочено познаване на проблема в различни аспекти и много добра информираност на авторката. Изложението е на висок професионален език и стил. Подходът към съществуващата информация от страна на дисертантката, в по голямата част на прегледа е задълбочен, което му придава характер на анализ. Всичко това убедително обосновава поставената цел на изследванията.

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

Целите на дисертационния труд е ясно и точно формулирани. Те са да се проучи класическата и популационна фармакокинетика на доксициклин при различни видове продуктивни бозайници – дребни преживни (овце, агнета) и зайци. Да се отчетат индивидуалните характеристики, фармакокинетичното моделиране да се колерира с някои биохимични показатели чрез методите на популационния анализ.

Избраните 5 задачи са в унисон с целите на дисертацията и тяхното комплексно изпълнение гарантира реализирането им от докторантката.

Собствените изследвания са извършени с достатъчен брой животни (лактиращи овце, агнета, зайци – полово зрели и подрастващи).

Използваните статистически методи в дисертационния труд са съвременни и точни, по която причина получените резултати приемам за достоверни.

Бих могла да обобщя, че с избраните методични подходи са създадени необходимите предпоставки за получаване от дисертантката на обективни научни данни. Благодарение на проведените изследвания са получени резултати, голяма част от които представляват реални научно-приложими приноси. Следва да отбележа, че докторантката прецизно и точно описва, с най-дребните детайли дизайна на всеки отделен експеримент извършен от нея.

5. Онагледеност и представяне на получените резултати

Дисертационният труд е написан на 145 стандартни страници, формат А4. Той включва резултатите от проведените от докторантката целенасочени проучвания, проведени в един изключително кратък, но изпълнен с много изследвания период.

Дисертацията отговаря на общоприетите изисквания и има всички изискуеми раздели – Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане, Изводи, Обобщение, Приноси, Списък на публикациите във връзка с дисертацията, Цитирания и Литературен указател.

Получените резултати са точно и подробно описани и добре онагледени, посредством 15 броя фигури и 26 таблици. Те са обработени вариационно-статистически с помощта на някои непараметрични (Kolmogorov-Smirnov test; Mann-Whitney U test; Pearson's chi-squared test) и параметрични (ANOVA; Student's t-test) методи със специализиран статистически софтуер (Statistica for Windows 10.0).

В 12 таблици (№№ 3-6, 11-16, 19-22), от приложените 26 към дисертацията, получените резултати са представени като геометрично средно (\bar{x}) \pm стандартно отклонение (SD), а в 3 таблици (№№ 17, 23 и 24) намерените стойности са представени като геометрично средно (\bar{x}) \pm стандартно грешка (SE).

6. Обсъждане на резултатите и използвана литература

В раздел „Обсъждане” на дисертационния труд е направен обстоен разбор на получените резултати. На този раздел от дисертацията са отделени 29 страници, съставляващи 42,05 % от нейния обем. Той се отличава със задълбоченост на научния анализ, който се базира не само на собствените резултати, но и на големия брой (201) литературни източника, използвани в дисертацията, от които 103 са от последните 10 години.

Направените тълкувания на получените резултати и сравнени със становищата на други автори от богатия литературен обзор, както и изказване на много места на собствено мнение ми дава основание да оценя високо този раздел, представляващ една от най-съществените части на всеки дисертационен труд.

7. Приноси на дисертационния труд

Дисертантката представя 7 оригинални приноса, от които 2 са и с приложен характер, показващи оригиналността на поставените цели и изпълнените задачи. Приносите са с подчертан фармакологичен характер, с насоченост за приложение при дребни продуктивни животни – овце и зайци.

Чрез настоящата дисертация докторантката предоставя своя разработен и валидиран HPLC метод с PDA детекция на доксициклин в биологични течности (кръвна плазма от овце, от зайци и овче мляко).

В настоящата дисертация се описва фармакокинетиката на изпитвания тетрациклин антибиотик след вътрешно приложение, позовавайки се на некомпартиментния фармакокинетичен анализ при агнета и полово зрели овце.

За пръв път чрез настоящия дисертационен труд са създадени популационни фармакокинетични модели за характеризиране поведението на доксициклин при овце и зайци.

Чрез създаденият популационен фармакокинетичен модел при овце се установява влиянието на възрастта на животните и свързаните с нея различия в телесното тегло, развитието на храносмилателния тракт при този вид дребни преживни и функцията на черния дроб върху фармакокинетиката на приложения антибиотик.

Чрез създаденият популационен фармакокинетичен модел за зайци се разкрива корелацията на някои биохимични параметри (албумин и ALT) с някои основни фармакокинетични параметри на антибиотика, като телесен клирънс (Cl_B) и привиден обем на разпределение (V_d).

8. Оценка за степента на лично участие на дисертанта в приносите

Докторантката е участвала лично в изпълнението на поставените задачи, потвърждение за което е специализацията и по „Популационно моделиране” в гр. Утрехт, курсът по „Статистически софтуер за обработка на данни”, публикациите в които тя е водещ автор, както и на двата доклада, представени от нея на научни форуми. Основната част от извършените експерименти, обработката на резултатите и представените приноси са нейно лично дело.

9. Критични бележки, въпроси и препоръки

Позволявам си да отправя няколко критични бележки, които са насочени към **няколко грешки, които с нищо не намаляват качествата на дисертационния труд !!!**

1. В дисертационния труд на страници 46, 49 и 50, в раздел III, както и автореферата на стр. 7, 9 и 10, в подразделите „Опитни животни”, „Експериментална процедура” и „Определяне на доксициклин в плазма и в мляко” има текст, в който подробно се описва работа със свине, продуктивни бозайници, които не са включени за експеримент, съгласно целите и задачите на дисертационния труд. Позовавайки се на заглавието на дисертацията „Фармакокинетика на доксициклин и популационно моделиране при бозайници” биха могли различни видове животни да бъдат включени в експеримент, включително и свине.

Предполагам, че изследвания с този животински вид са провеждани и те са били включени в дисертацията в един по-ранен етап, но след обсъждане на дисертационния труд на разширен Катедрен съвет на 12.11.2020 г. разделите свързани с този животински вид са отстранени от дисертацията и е останал неотстранен текст за свине само в раздел III. "Материал и методи" на дисертацията.

2. Резултатите в някои от таблиците (№№ 3-6, 11-16, 19-22) са представени като геометрично средно (\bar{x}) \pm стандартно отклонение (SD), а в 3 таблици (№№ 17, 23 и 24) намерените стойности са представени като геометрично средно (\bar{X}) \pm стандартно грешка (SE). По-добрият вариант е да се използва само стандартно отклонение във всички таблици (SD) или стойностите в таблиците да са представени само със стандартна грешка (SE), но не и по двата начина на представяне.

3. На страница 137 от дисертационния труд, сред използваните литературни източници към литературния обзор, фигурира и една от публикациите на докторантката, публикувана през 2019 г. в списание *Macedonian Veterinary Review*, която следва да е упомената само в раздел „Публикации, свързани с дисертационния труд”.

10. Публикувани статии и цитирания

Извършените от дисертантката изследвания са отразени в 3 научни публикации, в които тя е водещ автор. Те са написани на английски език, в списания с Импакт Ранк (SJR). Две са публикувани в списание издавано в Р. България – *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* и една в Северна Македония – *Macedonian Veterinary Review*.

Част от изследванията, включени в дисертационния труд са докладвани и на два научни форуми проведени в Р. България.

Авторефератът отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд. Той е написан на стандартни 48 страници. В него са включени по-голяма част от таблиците (15 броя) и фигурите (10 броя) от дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на научените и приложените от ас. Росица Милева методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и правилника на Тракийски университет за неговото приложение, което **ми дава основание да го оценя ПОЛОЖИТЕЛНО**. Няма да спестя да кажа, че за изминалите 3 години, през които Росица Милева е назначена за асистент и е зачислена за докторант тя се е справила отлично с поставените задачи, като се има предвид какъв дълъг период е необходим за да се усвои работата с високоефективен течен хроматограф, да се създаде подходящ и валидиран HPLC

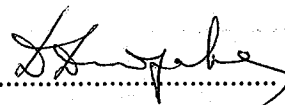
метод за установяване на количества от доксициклин в биологични течности – кръвна плазма и мляко. Необходими са месеци наред за усвояване работата с използвания съвременен фармакокинетичен софтуер – програмата Monolix[®] за популяционен фармакокинетичен анализ и Phoenix[®] Build 8.1.0.34. за класически фармакокинетичен анализ. Необходимо е и известно време за усвояване работата и със статистическия софтуер за обработка на получените резултати. Необходимо е много време за провеждане на опитните постановки с няколко животински вида. Следва да отбележа, че като асистент в Катедрата по фармакология, физиология на животните докторантката в същия период от 3 години тя е била ангажирана и с провеждане на практически упражнения по фармакология със студенти, но въпреки това тя успешно се е справила с поставените задачи по дисертационния труд.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури да гласува положително и да присъди на Росица Живкова Милева образователната и научна степен "Доктор".

08.02.2021 г.

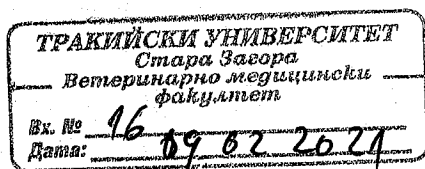
гр. София

Подпис:.....



(Проф. Д-р Д. Димитрова)

ДД/ДД



STANDPOINT

about a dissertation for obtaining PhD educational and scientific degree in filed of higher education 6.0. „Agrarian sciences and Veterinary medicine”, in professional area 6.4. „Veterinary medicine” on PhD programme “Pharmacology”.

Author of the dissertation paper: Assistant professor Rositsa Zhivkova Mileva – PhD student in individual training at the Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry” at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora.

Topic of the dissertation paper for awarding PhD educational and scientific degree: „Pharmacokinetics of doxycycline and population modelling in mammals”.

Scientific opinion prepared by: professor Dimitrichka Yordanova Dimitrova, DVM, PhD from the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Forestry - Sofia, field of higher education 6.0. „Agrarian sciences and Veterinary medicine”, professional area 6.4. „Veterinary medicine”, determined as member of Scientific jury with Order No. 3363/17 Dec 2020 by the Rector of Trakia University – Stara Zagora and resolution of the Scientific jury (Record No. 1/22 Dec 2020).

1. Brief presentation of the PhD student

Assistant professor Rositsa Zhivkova Mileva was born in the town of Radnevo, Stara Zagora region on 17 August 1988. She completed her higher education at the Faculty of Veterinary medicine, where in 2013 she acquired the educational degree „Master Veterinary surgeon”. Her length of service as an assistant professor started in 14 July 2017 at the Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry” at the Faculty of Veterinary Medicine, where she is currently teaching. The PhD student has good command of English, wich is evident from the CV enclosed to the documents, which allows her to handle freely scientific literature related to the dissertation.

To solve the set objectives and tasks in the dissertation paper, assistant professor Mileva has mastered within a very short period of time a number of methods and programs for working with a liquid chromatographic system with a mass spectrometer LC/MS-MS; for population pharmacokinetic modelling; for processing scientific data with specialized statistical software.

The PhD student has submitted in time, in printed and electronic version her dissertation paper, the self-abstract to it, as well as all required documents related to the open procedure for obtaining PhD educational and scientific degree.

During her PhD studies at the Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry, Rositsa Mileva also conducted practical exercises in pharmacology. It is

evident that she has good communication and organizational skills acquired in teaching and working with the students.

2. Relevance of the issue

The increase of antimicrobial resistance is a global and major problem in human and veterinary medicine. Although several strategies have been proposed to overcome and control antimicrobial resistance, this problem is still unresolved. It is the responsibility of veterinary and human doctors to stop the growing resistance of pathogenic microorganisms by applying the correct dosing mode of the antibacterial medicinal products used. This requires a good knowledge of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the antimicrobial drugs used in the treatment of bacterial infections in animals and humans. Unlike human medicine, under the conditions of modern industrial animal husbandry, very often the veterinarian is forced to use them for mass treatment of sick animals, and not only for individual therapy. In mass therapy of patients of the same animal species, significant interindividual differences in the pharmacokinetic "behaviour" of the medicinal product used are very common. In contrast to the classical compartmental and non-compartmental pharmacokinetic analysis, population pharmacokinetics allows the variability in the animal population to be traced and characterized.

In the present dissertation paper the pharmacokinetics of the tetracycline antibiotic – doxycycline has been studied after internal administration in small ruminants – sheep and lambs, as well as in other productive animals - in adolescent and sexually mature rabbits.

The dissertation paper presented to me is written on 145 pages, A4 format. It contains all the parts that a dissertation paper, namely: Introduction – 2.5 pages; Literary review – 32 pages; Own research, subdivided into: Objective and tasks – 1 page; Materials and methods – 21 pages, Results – 27 pages, Discussion – 29 pages. The sections "Summary", "Conclusions" and "Literary index" are 3, 2 and 23 pages, respectively. The report on the contributions of the dissertation paper is 1 page. At the end of the dissertation paper the following sections are to be found: Scientific publications in relation to the dissertation paper and Reports at scientific conferences in relation to the dissertation paper.

All contained sections are in harmonious proportions.

The research aims to present the results of pharmacokinetic studies of doxycycline in various species of mammals' – small ruminants and rabbits. The developed dissertation paper is up-to-date, with a high degree of economic and health significance.

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

The literature review is based on 201 literature sources (1 in Cyrillic and 200 in the Latin). The literature sources for the last 10 years (for the period 2010-2020) are 115 and make up 57.21%

of all used in the dissertation paper, of which 86 are from the last 5 years (period 2015-2020), making up 20.90% of all the literature used for writing the literature review.

The literature review has 6 main sections, the First of which contains data on antibiotic therapy in Veterinary medicine and the resistance of pathogenic microorganisms to the used antibacterial drugs.

The Second section of the literature review includes data on the chemical structure and physical characteristics of the tetracycline antibiotic used in the dissertation paper. It also contains information on the mode of action, the dosing mode and the doses used in productive animals and pets. In it has included publications that provision of information related to the side effects observed after the use of doxycycline, information on the average lethal dose (DL50) in laboratory animals, determined after internal administration of the antibiotic.

In the Third section of the literature review, the PhD student provides detailed information on the pharmacodynamics of the antibiotic used in the dissertation. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to various pathogens is included in this section. Information related to the main mechanisms by which pathogenic microorganisms develop resistance to the tetracycline antibiotic used is also provided.

The fourth section of the literature review includes information related to the pharmacokinetics of the antibiotic used after various routes of administration in productive and companion animals. This section discusses in detail the resorption, distribution, metabolism and elimination of the antibiotic after oral administration in different animal species. There is a separate subsection in which the PhD student discusses the pharmacokinetics in cases where doxycycline is used as a forms for oral and injectable administration.

The fifth section of the literature review is from publications related to pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling, in order to optimize the therapy with the antibiotic used in sick animals. In this section of the reference there is a place for the so-called "Population pharmacokinetics", providing information on the application of population methods for pharmacokinetic analysis to optimize therapy with the tetracycline antibiotic used.

The last (VIth) section of the Literature review is dedicated to a detailed description of the microbiological and apparatus (machine) methods for determination of doxycycline in biological products – blood serum, blood plasma and milk.

Macrostructure of the Literature review is in compliance with the scientific objectives and tasks of the dissertation paper. I could say that completeness has been achieved in terms of the type and tasks of the dissertation paper.

In its entirety, the Literature review shows a thorough knowledge of the problem in various aspects and a very good awareness of the author. The presentation is in high professional language

and style. The approach to the existing information by the PhD student in most of the review is thorough, which gives it the character of analysis. All this convincingly justifies the set objective of the research.

4. Purposes, tasks, hypotheses and research methods. Correspondence of the chosen research methodology with the set goal and tasks of the dissertation

The purposes of the dissertation paper are clearly and precisely formulated. They are to study the classical and population pharmacokinetics of doxycycline in various species of productive mammals – small ruminants (sheep, lambs) and rabbits. To take into account individual characteristics, pharmacokinetic modelling to be correlated with some biochemical parameters by the methods of population analysis.

The selected 5 tasks correspond to the objectives of the dissertation paper and their accomplishment guarantees their fulfilment by the PhD student.

Own research was performed with a sufficient number of animals (lactating sheep, lambs, rabbits – sexually mature and adolescents).

The statistical methods used in the dissertation paper are modern and accurate, for which reason I accept the obtained results as reliable.

I could summarize that the selected methodological approaches have created the necessary prerequisites for obtaining from the dissertation objective scientific data. Thanks to the conducted research, results have been obtained, most of which are real scientifically applicable contributions. I should note that the PhD student accurately and precisely describes, with the smallest details, the design of each individual experiment performed by her.

5. Visualization and presentation of the obtained results

The dissertation paper is written on 145 standard pages, A4 format. It includes the results from targeted research made by the PhD student, conducted within an extremely short period of time, but full of many studies.

The dissertation paper complies with the generally accepted requirements and has all the required sections – Introduction, Literature review, Purposes and tasks, Materials and methods, Results, Discussion, Summary, Conclusions, Contributions, List of publications in relation to the dissertation paper, Citations and Literature index.

The obtained results are accurately and in detail described and well illustrated, by means of 15 figures and 26 tables. They are processed variation-statistically using some non-parametric (Kolmogorov-Smirnov test; Mann-Withney U test; Pearson's chi-squared test) and parametric (ANOVA; Student's t-test) methods with specialized statistical software (Statistics for Windows 10.0).

In 12 tables (№№ 3-6, 11-16, 19-22), out of 26 enclosed in the dissertation paper, the obtained results are presented as geometric mean (\bar{x}) \pm standard deviation (SD), and in 3 tables (№№ 17, 23 and 24) the values found are presented as geometric mean (\bar{x}) \pm standard error (SE).

6. Discussion of the results and literature used

In the section "Discussion" of the dissertation paper a detailed analysis of the obtained results is made. A total of 29 pages are devoted to this section of the dissertation paper, constituting 42.05% of its volume. It is characterized by in-depth scientific analysis, which is based not only on its own results, but also on the large number (201) of literature sources used in the dissertation paper, of which 103 are from the last 10 years. The interpretations of the obtained results and compared with the opinions of other authors from the rich literature review, as well as the expression of own opinion in many places give me reason to appreciate this section highly, comprising one of the most important parts of any dissertation paper.

7. Contributions of the dissertation paper

The PhD student presents 7 original contributions, 2 of which are of an applied nature, showing the originality of the objectives set and the completed tasks. The contributions are of a definite pharmacological nature, with a focus on small productive animals – sheep and rabbits.

By means of this dissertation paper the PhD student provides her developed and validated HPLC method with PDA detection of doxycycline in biological fluids (blood plasma from sheep, rabbits and sheep milk).

The present dissertation paper describes the pharmacokinetics of the tested tetracycline antibiotic after internal administration, referring to the non-compartmental pharmacokinetic analysis in lambs and sexually mature sheep.

For the first time, population pharmacokinetic models for characterizing the behaviour of doxycycline in sheep and rabbits have been developed through the present dissertation paper:

The created population pharmacokinetic model in sheep contributed to establishing the effect of age of animals and the related differences in body weight, the development of the digestive tract in this type of small ruminants and the function of the liver on the pharmacokinetics of the administered antibiotic.

The created population pharmacokinetic model in rabbits revealed the correlation of some biochemical parameters (albumin and ALT) with some basic pharmacokinetic parameters of the antibiotic, such as body clearance (Cl_B) and apparent volume of distribution (V_d).

8. Assessment about the level of personal involvement of the PhD student in the contributions

The PhD student has personally participated in the implementation of the tasks set, which is confirmed by her specialization in "Population Modelling" in Utrecht, the course "Statistical software for data processing", the publications in which she is a leading author, and the two reports presented by her at scientific forums. The main part of the performed experiments, the processing of the results and the presented contributions are her personal work.

9. Critical notes, questions and recommendations

I allow myself to make a few critical remarks, which are aimed at **a few mistakes, which in no way reduce the qualities of the dissertation paper!!!**

1. In the dissertation paper on pages 46, 49 and 50, in section III, as well as in the self-abstract on pages 7, 9 and 10, in subsections "Experimental animals", "Experimental procedure" and "Determination of doxycycline in plasma and milk" there is a text that describes in detail the work with swine, productive mammals that are not included in the experiment, according to the purposes and tasks of the dissertation paper. Referring to the title of the dissertation paper "Pharmacokinetics of doxycycline and population modelling in mammals", various animal species could be included in the experiment, including swine. I assume that research with this animal species have been conducted and they were included in the dissertation paper at an earlier stage, but after discussing the dissertation paper by an extended Departmental Council on 12 Nov 2020, the sections related to this animal species were removed from the dissertation paper and the text for swine was not removed only in section III. "Material and methods" of the dissertation paper.

2. The results in some of the tables (№№ 3-6, 11-16, 19-22) are presented as geometric mean (\bar{x}) \pm standard deviation (SD), and in 3 tables (№№ 17, 23 and 24) the resulting values are presented as geometric mean (\bar{x}) \pm standard error (SE). A better option is to use only the standard deviation in all tables (SD) or the values in the tables to be presented only with standard error (SE), but not in both ways of presentation.

3. On page 137 of the dissertation paper, among the Literature sources used in the Literature review, there is one of the publications by the PhD student, published in 2019 in the *Macedonian Veterinary Review* journal, which should be mentioned only in the section "Publications related to the dissertation paper".

10. Articles published and citations

The research performed by the PhD student is reflected in 3 scientific publications in which she is the leading author. They are written in English in Impact Rank (SJR) journals. Two of them are published in a journal published in the Republic of Bulgaria – *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* and one in a Republic of Northern Macedonia – *Macedonian Veterinary Review*.

Part of the research included in the dissertation paper has been reported at two scientific forums held in the Republic of Bulgaria.

The self-abstract objectively reflects the structure and content of the dissertation paper. It is written on standard 48 pages. It includes most of the tables (15 pcs.) and figures (10 pcs.) from the dissertation paper.

CONCLUSION:

Based on the research methods learned and applied by Assistant professor Rositsa Mileva, the correctly performed experiments, the summaries and conclusions made, I think that the presented dissertation paper complies with the requirements of the Law on development of academic staff in a Republic of Bulgaria and the Rules of Trakia University for its application, which **gives me reason to assess it POSITIVELY**. I will not spare to say that for the past 3 years, during which Rositsa Mileva has been appointed as an assistant professor and enrolled as a PhD student, she did an excellent job, given how long it takes to master the work with highly effective liquid chromatograph, to establish an appropriate and validated HPLC method for determining doxycycline in biological fluids – blood plasma and milk. It takes months to master the use of modern pharmacokinetic software – Monolix[®] software for population pharmacokinetic analysis and Phoenix[®] Build 8.1.0.34. for classical pharmacokinetic analysis. It also takes some time to master the work with statistical software to process the results. It takes a lot of time to conduct experiments with several animal species. It should be noted that as an assistant professor at the Department of Pharmacology, Animal Physiology, the PhD student within the same period of 3 years was engaged in conducting practical classes in pharmacology with students, but still successfully she coped with the tasks concerning the dissertation paper.

I allow myself to propose to the esteemed Scientific jury to vote positively and to award Rositsa Zhivkova Mileva the PhD educational and scientific degree.

February 08, 2021

Sofia

Signature:.....

(Prof. D.Dimitrova, DVM)

DD/DD