

P-НО-290/19.03.2025

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Илия Димитров Костадинов, дм

Катедра по фармакология и клинична фармакология, Медицински факултет, МУ-
Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

Професионално направление: 7.3 „Фармация“ от област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“

Докторска програма: „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Автор: Кристина Юлианова Ставракева

Форма на докторантурата: редовна докторантура

Катедра: Фармакология, токсикология и фармакотерапия, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив

Тема: „Проучване на биологични ефекти на метанолов екстракт от *Micromeria frivaldszkyana* (degen) Velen. (Lamiaceae)“

Научни ръководители:

Доц. Елисавета Апостолова, дм; Ръководител на Катедра по фармакология, токсикология и фармакотерапия, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив

Проф. д-р Анелия Биволарска, дб; Ръководител на Катедра по Медицинска биохимия, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив;

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Въз основа на Решение от заседание на Факултетния съвет при Фармацевтичен факултет към Медицински университет – Пловдив по Протокол № 8/29.10.2024 г. и със Заповед № Р-946/25.02.2025 г. на Зам.-Ректор НИД на Медицински университет – Пловдив съм избран за член на научно жури по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ на Кристина Юлианова Ставракева. На основание Протокол № 1/27.02.2025 г. съм определен да изготвя рецензия по горепосочената процедура.

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с чл. 70 (1) от I. Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г. и включва следните документи:

- заявление до Ректора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат с подпис на докторанта;
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование;
- заповед на Ректора на МУ-Пловдив за зачисляване в редовна докторантура № Р-3651/11.12.2023; заповед за отчисляване с право на защита до една година № Р-899/31.10.2024 на Зам.-Ректор по НИД на МУ-Пловдив;
- заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план (№ Р-2105/20.06.2024 на Зам.-Ректор по НИД на МУ-Пловдив) и съответен протокол за издържан докторантски минимум по специалността;
- протокол от разширен катедрен съвет № 10/04.10.2024 за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури;
- дисертационен труд – 132 стр. ;
- автореферат (на български и английски език) – 61 стр. ;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията – 3 бр.;
- копия на научните публикации;
- списък на участията в научни форуми – 3 бр.;
- сертификат за получени кредити (152) от обучението по груповия учебен план;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- други документи, свързани с хода на процедурата – заповед за втори научен ръководител № Р-1018/01.04.2024 на Зам.-Ректор по НИД на МУ-Пловдив; заповед за тема на научната разработка № Р-1017/01.04.2024 на Зам.-Ректор по НИД на МУ-Пловдив.

Докторантът е приложил копия на 3 пълнотекстови публикации. Нямам забележки относно документите.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Кристина Юлианова Ставракева е родена на 21.10.1996 г. в гр. Пловдив. Завършва средно образование през 2015 година (Гимназия с хуманитарен профил „Св. Св. Кирил и Методий“, гр. Пловдив). През същата година, след успешно положен изпит, придобива сертификат за владеене на английски език ниво С1 (IELTS – Level Advanced C1). В периода 2017 – 2022 година изучава фармация в МУ-Пловдив. През 2022 година се дипломира и придобива висше образование на образователно-квалификационна степен „Магистър“ по специалност „Фармация“ с професионална квалификация „Магистър-фармацевт“. За кратко работи, като магистър -фармацевт в аптеки „Запад“ в гр. Пловдив.

Маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева е зачислена в редовна докторантура към Катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия към Фармацевтичен факултет на МУ-Пловдив, докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“ със срок на обучение 3 години, считано от 11.12.2023 г. (заповед № Р-3651/11.12.2023 на Ректора на МУ-Пловдив). Благодарение на добрата теоретична и практическа подготовка, организираност и отговорност към поставените задачи маг. фарм. Кристина Ставракева успява да приключи предсрочно подготовката на дисертационния си труд и е отчислена с право на защита до една година, считано от 29.10.2024 година (заповед № Р-899/31.10.2024 на Зам.-Ректор по НИД на МУ-Пловдив). На 21.01.2025 г., след успешно издържан конкурсен изпит, маг. фарм. Кристина Ставракева е назначена за асистент в Катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия към Фармацевтичен факултет на МУ-Пловдив. Докторантката е преминала обучение в Докторантското училище на МУ-Пловдив и има получени общ брой кредити 152 при задължителен минимум 129. Владее английски език ниво С1.

Маг. фарм. Кристина Ставракева има умения за работа с Windows, Microsoft Office, статистически програмен пакет SPSS v. 19, аптечна складова система PharmaStar. Докторантката е завършила курсове на тема „Артериално налягане“, „Инхалаторна техника“ и „Кръвна захар“ към Pharma Sim Center, МУ-Пловдив. Провела е обучение за работа с дигитална обучителна платформа Body interact за развитие на клиничното мислене и демонстрация на клинични случаи. Член е на Българския фармацевтичен съюз и Българското дружество по фармакология, клинична фармакология и терапия.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Лечебните растения са богат източник на биологично активни вещества с различна химическа структура. Поради това те имат потенциал в разработването на растителни лекарствени продукти и хранителни добавки. Многобройни са примерите за лекарствени средства, създадени на базата на вторичните метаболити, които се откриват в лечебните растения. В този смисъл проучването на възможните терапевтични ефекти на изолирани от растенията химични съединения с биологична активност е перспектива за разработването на нови лекарствени средства. От друга страна, биологично активните вещества в растенията съществуват в уникални комбинации по отношение на качествен и количествен състав, което води до постигане на благоприятни терапевтични ефекти при нисък риск от токсичност и нежелани реакции. Това обуславя засиления в последните години интерес към изследване ефектите на растителни екстракти, които съдържат комбинация от биологично активни вещества.

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем, свързан с изследване химичния състав и фармакологичните ефекти на екстракт от *Micromeria frivaldszkyana*. Родът *Micromeria* Ventham обхваща около 70 вида, от които четири са разпространени в България. В литературата има данни, че някои от видовете *Micromeria* са използвани в народната медицина и кулинарията на регионите в които се срещат. Съществуват експериментални проучвания, които доказват наличието на противовъзпалителен, антиоксидантен, антихолинестеразен, противомикробен и аналгетичен ефект. *Micromeria frivaldszkyana* представлява ендемичен за нашата страна растителен вид от този род, поради което проучванията върху фитохимичния състав и биологичната му активност са оскъдни. В научната литература има данни само за фитохимичния състав, антимикробната и антиоксидантната му активност, но липсват такива относно токсичност и други терапевтични ефекти. Това определя безспорната оригиналност и новаторство на извършеното проучване.

В настоящия дисертационен труд са получени подробни данни относно фитохимичния състав, включително съдържанието на вторични метаболити в *Micromeria frivaldszkyana*, събрана в определен регион на страната. Въз основа на литературните данни за биологичната активност на откритите в екстракта химични вещества докторантката си е поставила и целта да изследва определени фармакологични ефекти. Получените резултати за биологична активност поставят научните основи за по-нататъшното комплексно фармакологично изследване на това растение и евентуалното стандартизиране и приложение на екстрактите му в терапията на редица заболявания.

Актуалността на дисертационния труд се определя не само от избора на обект на изследване, но и от компетентно подбрения спектър от фармакологични ефекти, които са проучени. Лечението на болката, възпалението и деменциите е все още нерешен проблем на съвременната фармакотерапия, независимо от значимия напредък в тази посока. Перспективна е възможността за допълване на конвенционалното лечение с продукти на растителна основа. Не без значение е фактът, че върху образуването и количеството на вторичните метаболити в растенията съществено влияние оказват факторите на средата. В този смисъл дисертационният труд популяризира терапевтичните възможности на ендемичен за България вид, събран в определен географски район.

Особен интерес представлява изследването за хепатопротективен ефект. Известна е ролята на свободните радикали и оксидативния стрес във възникването и развитието на

чернодробното увреждане. Натуралните антиоксиданти имат роля в превенцията срещу медираното от свободни радикали чернодробно увреждане чрез повлияване на различни патофизиологични механизми. Редица хепатопротективни продукти са базирани на растителни източници. Получените резултати могат да дадат основата за бъдещо разработване на такива лекарства, на базата на екстракт от *Micromeria frivaldszkyana*.

4. Познаване на проблема

Маг. фарм. Кристина Ставракева демонстрира отлично познаване на разработвания проблем. Литературният обзор е написан компетентно и изчерпателно и се базира на обширна литературна справка. Обхваща 41 страници от дисертационния труд и е онагледен с 22 фигури, което значително улеснява възприемането на представената информация. Литературният обзор свидетелства за добрата информираност на докторантката по темата на дисертационния труд, умението ѝ да систематизира и анализира данните от научната литература.

Литературният обзор има седем части, които следват в логична последователност. В първата част на обзора докторантката представя детайлна информация относно ботаническата характеристика и разпространението на *Micromeria frivaldszkyana*. Анализирани са приложението в традиционната медицина и научните данни за биологичната активност на видовете от род *Micromeria*. В следващата част на обзора маг. фарм. Кристина Ставракева представя данни за фитохимичния състав на *Micromeria frivaldszkyana* и биологична активност на розмаринова киселина и хесперидин - съединения, намиращи се значително количество в растението. Тази информация подпомага докторантката при избора на фармакологични ефекти за провеждане на изследването, тъй като *Micromeria frivaldszkyana* не е изследван вид и липсват данни за биологичната му активност. Третата глава от литературния обзор е относно оксидативния стрес и антиоксидантите – значението им за здравето, методи за изследване на антиоксидантна активност, антиоксидантни ензими, биомаркери за оксидативен стрес и приложение на антиоксидантите в профилактиката на хроничните заболявания. Анализирани са оскъдните данни относно антиоксидантната активност на *Micromeria frivaldszkyana* и е направено сравнение с други видове от рода. В четвъртата част от обзора са разгледани методите за изследване на аналгетично действие в експериментални условия, а петата е посветена на механизмите на възникване на възпалителната реакция, медиаторите и клетките, които участват в нея, експерименталните модели за изследване на възпаление и литературните данни за противовъзпалителна активност на растенията от семейство Lamiaceae, към което принадлежи изследвания растителен вид.

В следващата глава са разгледани ролята на оксидативния стрес и възпалението при увреждане на нервната система, данните за невропротективен ефект на флавоноидите и методите за изследване на памет и обучение при експериментални условия. Последна глава на обзора е относно моделите на експериментално-индуцирана хепатотоксичност, маркерите на чернодробно увреждане и хепатопротективния потенциал на растенията от род *Micromeria* и съдържащите се в тях биологично активни вещества. Въз основа на доброто познаване на експерименталните модели и тестове маг. фарм. Кристина Ставракева подбира такива с добра прогностична валидност и висока информативна стойност при изграждане дизайна на дисертационния труд.

Представеният литературен обзор показва, че маг. фарм. Кристина Ставракева е отлично запозната с литературните данни по разработвания проблем, умее да ги анализира и използва при формулиране на задачите, избора на методи и интерпретация на получените резултати.

Обзорът завършва с кратко, но изчерпателно обобщение на литературните данни. То обосновава избора на *Micromeria frivaldszkyana* като обект на фармакологично изследване в дисертационния труд и очертава основните насоки на проучването – изследване на фитохимичен състав, остра токсичност, аналгетично, антиинфламаторно, подобряващо паметта, анксиолитично и хепатопротективно действие.

5. Методика на изследването

Дизайнът на проучването е подробно описан. Избраните методи са съвременни, надеждни и позволяват постигането на поставената цел. Описани са детайлно и прецизно, което гарантира възпроизводимост на получените резултати. Използван е изключително богат набор от *in vivo* и *in vitro* методи. Това е пряко доказателство за добрата практическа подготовка на докторантката. Анализът на вторичните метаболити в *Micromeria frivaldszkyana* е извършен с течна хроматография мас-спектрометрия (LC-MS), а първичните метаболити са анализирани с газова хроматография мас-спектрометрия (GC-MS). *In vivo* експериментите са проведени върху голям брой лабораторни животни, третирани предварително 7 или 14 дни, което е показател за трудоемко и с голям обем експериментално изследване. Докторантката е усвоила голям брой поведенчески и други методи за оценка на остра токсичност, регистриране на аналгетичен (тест „гореща плоча“, аналгезиметър), противовъзпалителен (плетизмометър), анксиолитичен и подобряващ паметта ефект (повдигнат кръстосан лабиринт, изследване на локомоторна активност с activity cage, two-way active avoidance, step-through и step-down passive avoidance test, разпознавателен тест и Y-лабиринт). Използвани са два модела на чернодробно увреждане (парацетамол и бутил-хидропероксид индуцирана хепатотоксичност). Серумните показатели за чернодробната функция (АсАт, АлАТ, алкална фосфатаза, билирубин) са определяни спектрофотометрично. Използван е ELISA метод за измерване маркери за оксидативен стрес (8-хидрокси дезоксигуанозин, малондиалдехид); показатели за антиоксидантна защита (каталаза, редуциран глутатион) и провъзпалителни цитокини (TNF- α и IL-6) в тъканни хомогенати от черен дроб.

Извършена е компетентна и коректна статистическа обработка на получените резултати със софтуерен продукт IBM SPSS var. 19.0

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран по изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“ с добър баланс между отделните раздели. Написан е на 132 страници, от които въведение (1 страница), литературен обзор (41 страници), цел и задачи (1 страница), материали и методи (13 страници), резултати и дискусия (38 страници), изводи (1 страница), научни приноси (1 страница). Библиографската справка е написана на 22 страници и включва 257 автора (97 от последните десет години). Дисертационният труд е онагледен с 45 фигури и 12 таблици.

Целта е ясно и точно формулирана. За изпълнението ѝ са поставени 7 задачи.

Разделите „Резултати“ и „Дискусия“ са обединени в един, като след точното и детайлно описание на получените резултати по всяка задача е представен техния анализ и възможните механизми на наблюдаваните фармакологични ефекти. Този раздел е онагледен с 23 фигури и 12 таблици. Представянето на резултатите следва в логична последователност на поставените задачи и е обособено в 2 части - фитохимичен състав и лабораторни тестове. В първата част са описани резултатите от анализа на съдържанието на първични и вторични метаболити в изследвания екстракт. Идентифицирани са 123 вторични метаболити, предимно флавоноиди и техните гликозиди, като най-високи са нивата на линарин и неговите деривати, хининова киселина, деривати на кверцетин, кемпферол, нарингенин и апигенин. Откриват се и значителни количества розмаринова киселина. Данните са съпоставени с наличните в литературата относно химичния състав на *Micromeria frivaldszkyana* и други видове от рода.

Втората част е обособена в 6 подраздела, съответно на поставените задачи. В първия подраздел са представени резултатите от проведените опити за остра токсичност. Не са установени леталитет и токсичност при дози до 5 g/kg. Въз основа на получените резултати докторантката избира дозите за *in vivo* експериментите. В следващите два подраздела са представени резултатите от изследване на аналгетичен и противовъзпалителен ефект. Не са установени данни за обезболяващ ефект, но се регистрира редукция на карагенин-индуцирания оток в първите 3 часа след инжектирането му. Докторантката дава възможно обяснение на наблюдавания противовъзпалителен ефект въз основа биологичната активност

на откритите в екстракта вторични метаболити. В четвъртия подраздел са представени резултатите от изследване ефекта на екстракта върху паметовите функции и тревожността. Не е установен усилващ паметта ефект, но се регистрира потенциален анксиолитичен ефект.

В следващия раздел са описани промените в показателите за чернодробна функция, оксидативен стрес, антиоксидантна защита и про-възпалителни цитокини при плъхове с два експериментални модела на хепатотоксичност. При парацетамол-индуцирана хепатотоксичност е установено, че екстрактът намалява нивата на трансминази, малоналдеhid и 8-хидрокси дезоксигуанозин, докато тъканното ниво на редуциран глутатион се повишава. Регистрирани са и достоверно по-ниски концентрации на TNF- α в черния дроб. При бутил-хидропероксид индуцираното чернодробно увреждане екстрактът намалява нивата на трансминазите и малондиалдехида. Докторантката компетентно обсъжда евентуалните механизми на наблюдаваните промени, като се базира на биологичната активност на съдържащите се в екстракта съединения и данните за антиоксидантното му действие.

В заключението са представени основните резултати от проведеното изследване на екстракт от *Micromeria frivaldszkyana* и връзката между фитохимичния му състав и наблюдаваните фармакологични ефекти.

Маг. фарм. Кристина Ставракева е формулирала 3 извода по отношение фитохимичния състав на екстракта и 5 извода по отношение на изследваната биологична активност. Те съответстват на получените експериментални резултати и напълно отговарят на поставените задачи.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приносите на дисертационния труд са разделени на научно-теоретични и научно-приложни. От теоретична гледна точка съществен е фактът, че за пръв път е изследвана остра перорална токсичност и е проведен пълен метаболомен анализ на метанолов екстракт от ендемичния за нашата страна растителен вид *M. Frivaldszkyana*. Открито е високо съдържание на фенолни киселини и флавоноиди, което предполага многообразна биологична активност. С висока научна стойност са приносите с приложно значение. За първи път е установен противовъзпалителен и потенциален хепатопротективен ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana*. Това е предпоставка за бъдещи изследвания с оглед евентуалното приложение на екстракти от растението, в подходяща лекарствена форма, като спомагателна терапия към конвенционалните противовъзпалителни и хепатопротективни лекарствени средства. Приемам приносите на дисертационния труд.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Маг. фарм. Кристина Ставракева е приложила 3 пълнотекстови статии и 3 участия в научни форуми по темата на дисертационния труд. Две от пълнотекстовите статии са в списания индексирани в международни бази данни – една публикация в българско списание индексирано в Scopus (Acta Medica Bulgarica) и една в чуждестранно списание индексирано в Web of Science (International Journal of Molecular Sciences, IF₂₀₂₃=4,9). Третата статия е в сборник доклади от международна научна конференция в България. От посочените научни форуми един е в чужбина и два в България. Във всички публикации и две от научните съобщения докторантката е първи автор.

Посочените данни за публикационната активност на докторантката са свидетелство за уменията ѝ да анализира, обобщава и представя данните от експерименталните изследвания в публикации и научни форуми. Броят и видът на публикациите отговарят на изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“ според Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на МУ-Пловдив.

9. Лични впечатления и лично участие на докторантката

Познавам маг. фарм. Кристина Ставракева още от явяването ѝ на конкурса за редовен докторант в Катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия към Фармацевтичен факултет на МУ-Пловдив. Тя се отличава с висока теоретична и практическа подготовка, аналитично мислене, организираност и отговорност към поставените задачи. Личните ми

впечатления, дисертационният труд, авторефератът, презентацията при отчисляване, както и научните публикации и участия в научни форуми, в повечето от които докторантката е първи автор, ми дават основание да считам, че проведеното изследване, получените резултати и формулираните приноси от проучването са нейна лична заслуга.

10. Автореферат

Авторефератът на дисертационния труд е оформен според изискванията и съдържа 61 страници. Онагледен е с 21 фигури, 5 таблици и отразява в синтезиран вид основното съдържание на дисертационния труд – използваните методи, получените резултати, обсъждане, изводи и формулираните приноси.

11. Критични забележки и препоръки

Нямам критични забележки към проведеното изследване и представените материали.

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръката ми е да разшири изследванията относно фармакологичната активност на екстракта от *M. Frivaldszkyana* и да продължи да публикува резултатите в списания, реферирани в световно-известни бази данни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева е посветен на актуална и важна тематика. Проучването върху химичния състав и биологичната активност на екстракта от *Micromeria frivaldszkyana* е иновативно и представлява солидна научна основа за бъдещи изследвания и потенциалното му клинично приложение. Докторантката има отлична литературна информираност относно изследвания проблем, овладяла е богат набор от съвременни *in vitro* и *in vivo* методи за изследване, които използва при изпълнението на формулираните задачи. Получените резултати са последица от обемистото и трудоемко научно изследване, което е прецизно планирано и проведено. Те са документирани точно и детайлно. Приносите на дисертационния труд са оригинални и имат научно-теоретична и научно-приложна стойност.

Маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева е изграден специалист по фармакология, който притежава задълбочени теоретични познания и практически умения, демонстрира качества за самостоятелно планиране и провеждане на научно изследване.

Представеният дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ-Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ-Пловдив за приложение на ЗРАСРБ.

Убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева в докторска програма по „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“; професионално направление: 7.3 „Фармация“ от област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“.

17.03.2025

Заличено на основание
Чл.5 §1, б.„В“ Регламент (ЕС)2016/679

Изготвил становището:
(доц. д-р Илия Костадинов, дм)