

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Снежа Златева Златева, д.м.

МУ „Професор д-р Параскев Стоянов“ - Варна

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

професионално направление 7.3. „Фармация“

докторска програма „Фармакология /вкл. фармакокинетика и химиотерапия“

Автор: маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева

Форма на докторантурата: редовна подготовка

Катедра: „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, ФФ, МУ-Пловдив

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

Научен ръководител: доц. Елисавета Апостолова, дм и проф. д-р Анелия Биволарска, дм. Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“ на МУ Пловдив

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и науча степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ 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
- заповеди за записване в докторантура
- заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит или докторантски минимум по специалността
- протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на досертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на научните публикации
- списък на участията в научни форуми
- списък на забелязани цитирания
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи
- други документи, свързани с хода на процедурата

Докторантът е приложил 3 публикации.

Бележки и коментар по документите: Документите са добре оформени и представени.

Акцент върху биографични данни във връзка с процедурата.

КРИСТИНА ЮЛИАНОВА СТАВРАКЕВА е родена на 21.10.1996 в гр. Пловдив. Завършва МУ Пловдив, Фармацевтичен Факултет с придобита специалност магистър-фармацевт през 2022 г. Започва работа в Аптеки Пловдив. Зачислена като редовен докторант към ФФ на МУ Пловдив със Заповед № Р-3651/11.12.2023г. От 21.01.2025 започва работа в Медицински Университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет, катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“ на длъжност асистент като участва в учебно-преподавателска, научно-изследователска дейност на катедрата, води практически занятия със студенти, провежда колоквиуми, участва в изпитни сесия, участва в развитието на научно-изследователската дейност на катедрата.

2. Актуалност на тематиката

Растенията от семейство Устоцветни (Lamiaceae), род Микромерия се срещат на много места в Европа и хората ги използват за редица заболявания. Конкретно, растението Фривалдскиева микромерия - *Micromeria frivaldszkyana* е ендемично за България, но има крайно малко научни публикации за неговата токсичност, състав на биологично активните вещества и какви точно биха били неговите ползи за хората. По литературни данни, видът *Micromeria* притежава активни вещества от интерес за медицината. Дисертантът Ставракева си поставя конкретни задачи да проучи експериментално Фривалдскиева микромерия в България, конкретно качествения и количествен състав на нейните активни вещества и дали те притежават остра токсичност, дали имат аналгетично, противовъзпалително, хепатопротективно действие и повлияват ли когнитивните функции. Това са актуални заболявания в България, от които страдат много хора. В този смисъл считам, че проведеното проучване и конкретните задачи са актуални и доказателствата са убедителни, както в научно-теоретичен аспект, така и факта, че българската Фривалдскиева микромерия ще бъде от интерес при разработване на нови медикаменти или хранителни добавки.

3. Познаване на проблема

Маг. фармацевт Кристина Юлианова Ставракева е отлично запозната с необходимостта да се проучат и използват като източник на биологично активни вещества повече растения с цел разкриване на техния терапевтичен потенциал. В Литературния обзор тя подробно представя информация за целия род *Micromeria*, общата характеристика, ботанически особености и разпространение на различните видове растения от този род, използването им в традиционната медицина, фитохимичен състав и главните биоактивни съединения в различните видове от този род. Подробно са разгледани стандартизираните и валидизирани *in vivo* методи (животни), с които се оценяват биоактивните съединения по отношение на антиоксидантна активност, аналгетичен ефект, повлияване на различни видове възпаление, влияние върху чернодробните и когнитивните функции.

Дисертантът Кристина Юлианова Ставракева творчески разглежда литературния материал. Оценява *Фривалдскиева микромерия* към застрашените видове в България, поради което този растителен вид е останал все още неизследван. Оскъдната информация за състава е предпоставка за по-задълбочено проучване на метаболитите на растението с цел установяване

на връзка между фитохимичния състав и биологичната му активност, както и профила на безопасност. Маг. фармацевт Кристина Ставракева подробно представя известното и открито за растенията от род *Micromeria*, тяхната активност и точните тестове, които биха разкрили свойствата на българското растение Фривалдскиева микромерия.

4. Методика на изследването

Избраните методи на изследване позволяват да се постигне поставената цел за проучване химичния състав и биологичните ефекти на екстракт от надземните части на българското ендемично растение Фривалдскиева микромерия и да се получи адекватен отговор дали притежава аналгетично, противовъзпалително, антиоксидантно, невропротективно (когниция) и токсини свойства.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертацията е структурирана много добре, общо материалът е изложен на 132 страници и включва 8 глави (ВЪВЕДЕНИЕ, ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ, РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ИЗВОДИ, ПРИНОСИ и БИБЛИОГРАФИЯ).

ВЪВЕДЕНИЕТО ни представя различните видове растения от род *Micromeria* и използването им в народната медицина като антиревматично, антисептично, антимикробно, антиоксидантно, гастропротективно, хепатопротективно, противовъзпалително, антихолинестерно, стимулиращо централната нервна система (ЦНС) и общо тонизиращо средство. Въведението ни информира за българския ендемичен вид, който не е добре изследван. Дисертантът Кристина Ю. Ставракева счита, че нейното проучване ще обогати информацията относно фитохимичното съдържание на Фривалдскиева микромерия, ще увеличи познанията относно състава му и ще подпомогне характеризирането на биологичния му потенциал. Маг. фармацевт Ставракева счита, че разкриването на непознати свойства на българския ендемичен вид на растението ще определи пригодността му за употреба и може ли да послужи като източник за синтезиране на нови лекарствени средства или хранителни добавки.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е структуриран в 7 подглави.

В подглава 1 е дадена обща характеристика на Фривалдскиева микромерия с нейните ботанически особености и разпространение и значението на растението в традиционната медицина и съвременната наука.

В подглава 2 е даден фитохимичния състав на *Micromeria frivaldszkyana*, описани са главните биоактивни съединения и специално внимание се отделя на тези от съединенията в растението, които имат антиоксидантни и противовъзпалителни свойства.

В подглава 3 теоретично се представя значението на антиоксидантите за здравето: защита срещу оксидативен стрес и клетъчни увреждания. Теоретично се прави преглед на методите за оценка на антиоксидантна активност и антиоксидантните ензими и маркери. Прави се анализ на наличните литературни данни за антиоксидантния потенциал на метаноловия екстракт от *Micromeria frivaldszkyana* в сравнение с други видове от семейство *Lamiaceae*. Дава се кратка информация за патогенетичната роля на свободните радикали при редица хронични заболявания със социално значение и ползата от приложението на антиоксиданти за тяхната превенция.

В подглава 4 се разглежда болката и нейната патогенеза, подробно се описват *in vivo* методите, с които се оценява аналгетичния ефект на химичните съединения при болка причинена от механичен, химичен, термичен и студов стимул.

В подглава 5 се описва патогенезата на възпалителния процес, моделите и химическите маркери на възпаление, данните за противовъзпалителни свойства на други растения от семейство *Lamiaceae* (машерка, мента, розмарин, лавандула и други) и се отбелязва липсата на такива за българското ендемично растение Фривалдскиева микромерия.

В подглава 6 се разглежда влиянието на оксидативния стрес върху невродегенеративните заболявания и възпалението в мозъка, които повлияват когнитивните функции (обучение, памет, внимание, перцепция, език, интелигентност). Представят се резултати от предходни изследвания за ефектите на биоактивни растителни екстракти върху паметта и поведението, както и *in vivo* модели за изследване на влияние върху когнитивните функции.

В подглава 7 се разглеждат клетъчни, молекулярни и биохимични изменения при чернодробно увреждане, измерваните параметри при увреждане, значението на оксидативния стрес и лечебния потенциала на някои от химическите съединения открити във Фривалдскиева микромерия. Разглеждат се *in vivo* модели за експериментална химична, медикаментозна и предизвикана от нестероидни противовъзпалителни средства хепатотоксичност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ Накрая се прави обобщение на литературните данни, от които логично следва поставянето на целта и задачите

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ. Целта е ясно определена, а задачите за постигането ѝ са 7: получаване на метанолов екстракт от надземните части на *Micromeria frivaldszkyana* (*Lamiaceae*); определяне на химичния състав на екстракта; острата токсичност; сравнително изследване на аналгетично и противовъзпалително действие на екстракта в сравнение със стандарта розмаринова киселина при плъхове; сравнително изследване на ефекти на екстракта върху процесите обучение и памет при плъхове и изследване на хепатопротективно действие на екстракта при модели на хепатотоксичност при плъхове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ. Използан е растителен материал от надземни части от Фривалдскиева микромерия събрана през месец юни (по време на пълен цъфтеж) вегетационен период 2019-2020 г. от Природен парк „Българка“, флористичен район Стара планина (средна) в областта на връх Шипка. Първичните метаболити са анализирани с GC-MS, а специализираните (вторични) метаболити, водно-метаноловите екстракти с UPLC-MS-MS. Експериментите с получените първични и вторични метаболити от Фривалдскиева микромерия са проведени върху мъжки плъхове порода Wistar и са осъществени при спазване на изискванията на Желзинкската конвенция и Наредба №20 от 01 Ноември 2012. Животните се разпределят в клетки по групи от 8 броя съгласно изискванията на Българската Агенция по Безопасност на Храните (БАБХ) с разрешително № 352/ 30 Май 2023 и с протокол № 6/05 Октомври 2023 от Етичната комисия към МУ-Пловдив. Спазени са стандартите за работа с животни.

Използвани са методи за определяне на остра токсичност; изследва се екстракта за аналгетично действие с тест с термичен стимул “гореща плоча” и тест с механичен стимул „Аналгезиметър“. Изследва се противовъзпалителното действие при модел на възпаление на задна лапа на гризач. За оценка на влиянието върху когнитивните функции се изследва локомоторната активност; опознавателен рефлекс; two-way active avoidance test (тест за активно двупосочно избягване с наказателно подкрепление); step-through passive avoidance test (тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление); step-down passive avoidance test (тест за па-

сивно избягване с наказателно подкрепление); изследва се пространствена работна памет (Y-maze) поведениета на тревожност чрез повдигнат кръстосан лабиринт (X-maze) и тест за разпознавателна памет (new object recognition test). Методът за изследване на хепатопротективното действие е при модел на хепатотоксичност предизвикана от парацетамол и t-BHP, чрез определяне на маркери на чернодробната функция в серум, на оксидативния стрес, антиоксидантна защита и нивата на провъзпалителните цитокини в чернодробен хомогенат. Резултатите от експериментите се обработват с програмата SPSS 19.0.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.

Определен е фитохимичния състав, първичните метаболити в растенията, които нямат връзка с биологичната им активност, липидите и вторичните метаболити, чиято биологична активност е анализирана. Според дисертанта, за първи път е осъществено изследване за токсичност на екстракт от *M. frivaldszkyana* in vivo. Резултатите показват липса на токсичност след перорално приложение на мъжки плъхове Wistar. Експериментите продължават с дози 250 и 500 mg/kg., които са 1/10 и 1/20 от определената LD50 (5000 mg/kg т.м. в случая).

При тест с механичен натиск на лапата (аналгезиметър) и при тест с термичен болков стимул, екстрактът от растението не показва аналгетично действие след 14-дневно приложение.

Резултатите от приложението на метанолов екстракт от *Micromeria frivaldszkyana* при оток на задна лапа индуциран от карагенин при плъхове, приложен перорално за 14 дни, намалява отока на задна лапа по време на ранната фаза на възпаление (първи до трети час след инжектиране на карагенин). Този резултат дисертантът дискутира, че може да бъде свързан с намалена продукция на свободни радикали, намалени нива на проинфламаторни цитокини, азотен оксид и намалена COX-2 активност. Регистрираната противовъзпалителна активност дисертантката свързва с антиоксидантните характеристики на екстракта.

Резултатите от изследване на екстракта от *Micromeria frivaldszkyana* върху когнитивните функции показват тенденция за повишаване на двигателната активност спрямо контролната група и при доза 500 mg/kg тестът в кръстосан лабиринт (X maze) екстрактът показва потенциално анксиолитично действие след 14-дневно приложение при плъхове. При останалите методите за активно обучение няма статистически значима разлика в латентното време на третираните групи спрямо контролата.

Изследване на хепатопротективното действие на метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* потиска продукцията на свободни радикали (понижени маркери на оксидативен стрес), но не повишава активността на антиоксидантните ензими.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. То включва обобщение от цялостният анализ на метанолов екстракт от *M. Frivaldszkyana*, който доказва наличие на: първичните метаболити (захароза, глюкоза, маноза, фруктоза, полифеноли и захарни алкохоли в най-голямо количество); липиди от които триацилглицеролите са най-изобилни; неорганичните елементи (K, Mg, Zn и Ca в голямо количество); вторични метаболити (флавоноиди и полифенолите линарин, хлорогенова и розмаринова киселина, рутин, еупаторин, кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин).

Дисертантката обобщава in vivo резултатите, най-важни от които са липсата на остра токсичност при мъжки плъхове Wistar при перорално приложение на дози до 5000 mg/kg т.м.;

Обобщава се намерената биологична активност: След 14-дневно перорално приложение на 250, 400 и 500 mg/kg т.м. на екстракта от *M. frivaldszkyana* се разкрива противовъзпалителния потенциал при модел на карагенин-индуциран оток на задна лапа при плъхове. Маг.

фармацевт Ставракева посочва, че наблюдаваната противовъзпалителна активност на екстракта се свързва с високите концентрации на флавоноиди и фенолни съединения (хлорогенова и розмаринова киселина, рутин, еупаторин, кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин). К. Ставракева посочва, че установения хепатопротективен ефект при хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол и t-BHP се дължат на антиоксидантната активност на флавоноидите в екстракта от *M. frivaldszkyana*,

ИЗВОДИ. Те са правилни, извлечени от резултатите от направените експерименти.

По отношение на фитохимичния състав на растението:

1. Идентифицирани са 83 съединения чрез GC-MS анализ, класифицирани като аминокиселини, органични киселини, захари и захарни алкохоли.

2. Идентифицирани са общо 163 липидни съединения, разпределени в 10 класа, чрез липидомично изследване на неполярната фракция.

3. Открити са 192 съединения – 123 идентифицирани и 69 неизвестни съединения чрез UPLC-MS-MS анализ на проби от метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana*. Вторичните метаболити с най-високи концентрации са флавоноиди, предимно флавоноидни гликозиди. Розмариновата киселина е сред най-значимите открити вещества.

По отношение на изследваните биологични активности:

1. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* не предизвиква токсични ефекти при перорално приложение на плъхове в дози до 5000 mg/kg телесна маса.

2. Екстрактът от растението не показва аналгетично действие при тестове с механичен и термичен болков стимул.

3. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* и в трите изследвани дози притежава противовъзпалителен ефект при модел на остро ексудативно възпаление, предизвикано от карагенин.

4. Приложението на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* не повишава пространствената работна и епизодична памет при нативни плъхове, но на базата на фитохимичния му състав такъв ефект би могъл да се очаква при модели на увредена памет.

5. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* повлиява оксидативния стрес при експериментални модели на хепатотоксичност предимно чрез потискане продукцията на свободни радикали (понижени маркери на оксидативен стрес), а не чрез повишаване активността на антиоксидантните ензими. Това обуславя неговата предимно превантивна роля при увреждания на черния дроб.

ПРИНОСИ. Те са с научно-теоретично и научно-приложно значение. Приносите са извлечени от много добре проведеното проучване на самия екстракт от Фривалдскиева микромерия от България и идентифицираните първични и вторични метаболити, липидни съединения и микроелементи. Проведените експерименти с животни за установяване на биологичната активност на растението са много добре проведени, оценени са ефектите на различни дози, анализирани са точните биомаркери. Статистическата обработка на данните, заедно с много добре изработените графики, ни убеждават с голяма категоричност в наличието или липсата на предполагаемите биологични ефекти.

Приноси с научно-теоретично значение са: 1. Установяване за пръв път липсата на остра токсичност на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* след перорално приложение при плъ-

хове и 2. За пръв път доказване на всички метаболити, най-важните от които са високото съдържание на фенолни киселини и флавоноиди, потенциално отговорни за наблюдаваните биологични активности.

Приноси с научно-приложно значение са доказването на хепатопротективен и противовъзпалителен ефект на метанолов екстракт от *M. Frivaldszkyana*.

Тези приноси придават значимост на проучването за науката и практиката, защото теоретично обогатяват знанието за това растение, срещано се на много места в България, най-вече с доказателствата за неговия състав, липсата на токсичност и възможността да бъде използвано за създаване на хепатопротективни и противовъзпалителни медикаменти или хранителни добавки, което е една перспектива за задълбочаване на изследванията.

БИБЛИОГРАФИЯ. Тя включва 257 източника, като само 2 са на кирилица. Цитираните публикации са съвременни изследвания.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Обобщено, представени са три публикации, в които маг. фармацевт К. Ставракева е първи автор. В две публикации тя е част от колектив, единият международен, а другият е от български учени. В една публикация е самостоятелен автор. Всички статии отразяват различни аспекти, отразени след това и в дисертацията. Най-високо е оценена работата на Ставракева в международен колектив, който отразява качеството и количеството на активни съединения в балканския вид Микромерия. Тази публикация (*International Journal of Molecular Sciences*. 2024, May 15) е с имакт фактор IF 2022 - 5.6, Q1.

Класификацията е следната: статии 3; доклади -3. По значимост - статии в издания с импакт-фактор 1; пленарни доклади – 2 броя; статии в реферирани международни списания – 1 брой, статии в национални списания – 2 броя; доклади на международни научни конференции в чужбина – 1 брой (постер); доклади на международни научни конференции в България – 1 брой; доклади на национални научни конференции, сесии и семинари – 1 брой; доклади в университет на английски език -МУ Пловдив – 1 брой.

Видно е личното участие на маг. фармацевт К. Ставракева в проведеното дисертационно изследване, като формулираните приноси и получени резултати са както нейна лична заслуга, така и на двамата научните ръководители.

Критични забележки нямам. Препоръчвам да се задълбочат изследванията, за да се свърже тази сериозна научна работа с реалното използване на ендемичното за България растение Фривалдскиева микромерия като лечебно средство. Считам, че добре овладените методи *in vivo* са една добра предпоставка, дисертантката маг. фармацевт Кристина Ставракева да задълбочи своите научни интереси в търсене и разкриване на лечебния потенциал и на други растения от България.

7. Автореферат

Авторефератът е представен на 61 страници, добре структуриран и онагледен с 45 фигури и 12 таблици. Отговаря на изискванията за структуриране, което включва ВЪВЕДЕНИЕ, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ, РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ИЗВОДИ, ПРИНОСИ, СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД и БЛАГОДАРНОСТИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания 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.

Дисертационният труд показва, че докторантката маг. фарм. Кристина Юлианова притежава притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност 7.3. Фармация, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнатите резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен 'доктор' на маг. фарм. Кристина Юлианова Ставракева** в професионално направление 7.3. „Фармация“, докторска програма „Фармакология /вкл. фармакокинетика и химиотерапия“

17.03.2025 г.

Изготвил становището: .

Проф.д-р Снежа Златева, д.м.

(акад. дл., име и фамилия, н. ст.)

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