

**ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ,
ОПРЕДЕНО СЪС ЗАПОВЕД № 2381/28.07.2026 г.
НА РЕКТОРА НА МУ – ПЛЕВЕН**

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Диана Илиева Пендичева-Духленска, д.м.
Ръководител катедра „Фармакология и токсикология“, Факултет „Фармация“,
Медицински университет – Плевен

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“.

Автор: д-р Пламен Красимиров Кръстев

Форма на докторантура: самостоятелна подготовка

Катедра: „Фармакология и токсикология“, Факултет „Фармация“, Медицински университет – Плевен

Тема: „Ефекти на U-74389G в експериментални модели на белодробна токсичност и колит при плъхове“

Научни ръководители: проф. д-р Галя Цветанова Ставрева-Маринова, д.м., и доц. д-р Виолета Йорданова Данчева, д.м.

Със Заповед № 2381/28.07.2026 г. на Ректора на Медицински университет – Плевен съм назначена за член на Научно жури по процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ от д-р Пламен Красимиров Кръстев. На първото неприсъствено заседание на Научното жури на 01 август 2026 г. съм определена да изготвя рецензия относно представения дисертационен труд.

Общо представяне на процедурата

Всички документи и материали, предоставени на електронен носител, са в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на

академичния състав на МУ – Плевен (2022). Комплектът е подреден коректно и пълно, което улеснява проследяването на проведената процедура.

Не са допуснати нарушения на процедурните изисквания. Не установявам данни за плагиатство в предоставения ми за оценяване дисертационен труд.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси с кандидата по смисъла на действащата нормативна уредба.

Кратки биографични данни и професионално развитие

Д-р Пламен Красимиров Кръстев е роден на 29.12.1969 г. в гр. Плевен. През 1987 г. завършва Математическа гимназия „Гео Милев“ – Плевен. Дипломира се като магистър-лекар във ВМИ – Плевен през 1995 г. (Диплома № 003057/20.11.1995 г.). През 2003 г. придобива и магистърска степен по специалност „Финанси“ във Великотърновски университет (Диплома серия ВТУ 2003, рег. № 12718/2003). Притежава две медицински специалности – „Авиационна медицина“ (ВМА – София, 2000 г.) и „Обща медицина“ (Свидетелство серия ВМИ 2002, № 0883).

Професионалния си път д-р Кръстев започва в системата на военномедицинското осигуряване: от октомври 1996 г. до юли 2002 г. е началник на медицинска служба на поделение 38960 в с. Телиш; от юли 2002 г. до юни 2005 г. е лекар-ординатор в медицинския пункт на УБ „Христо Ботев“ – Плевен; от юни 2005 г. до май 2007 г. е заместник-началник на медицинския пункт на поделение 24870 в с. Каменец; от юни 2007 г. до март 2015 г. е заместник-началник на медицинския пункт на военно формирование 52090 в гр. Долна Митрополия.

След успешен конкурс, през септември 2015 г. д-р Кръстев е назначен за асистент в катедра „Фармакология и токсикология“ на МУ – Плевен, където понастоящем е преподавател и участва в практическото обучение на студенти по медицина във Факултет „Медицина“ и студенти от специалност „Медицинска сестра“ в Медицински колеж.

Д-р Кръстев владее отлично писмено и говоримо английски и руски език. За повишаване на квалификацията си е преминал обучение по „Здравен мениджмънт за ръководители на лечебни заведения“, както и „Captain's Career Course“ за кариерно развитие на висшите медицински кадри във въоръжените сили на САЩ, проведен във военните бази „Lackland AFB“ и „Fort Sam Houston“, гр. Сан Антонио, Тексас (02.2010 – 09.2010 г.). Докторантът притежава много добри компютърни и дизайнерски умения, които проличават и в качественото графично онагледяване на дисертационния труд.

Актуалност на разработвания проблем

Темата на дисертационния труд е актуална и е свързана с две социално значими групи заболявания – интерстициални белодробни болести с изход белодробна фиброза и възпалителни заболявания на червата. И двете състояния влошават трайно качеството на живот, трудно се диагностицират и лекуват, а наличната терапия е предимно патогенетична, скъпоструваща и свързана с риск от нежелани лекарствени реакции при продължително приложение, което поставя значим акцент върху необходимостта от съвременни научни изследвания в тази насока.

Индуцираната от лекарства интерстициална белодробна болест е сериозен клиничен проблем с нарастващи доказателства от изследвания на медикаменти, потенциално свързани с нейното развитие, включително моноклонални антитела, биологични продукти, химиотерапевтици, инхибитори на имунни контролни точки, антибиотици, антиаритмици и други съвременни терапии.

Амиодаронът е сред класическите и клинично значими причинители на белодробна токсичност, което прави целенасочен и подходящ избора на амиодарон-индуциран експериментален модел при изследваните от докторанта лабораторни животни. Възпалителните заболявания на червата също показват нарастваща честота, включително в страни с ниски и средни доходи, и към момента нямат етиологично лечение.

Обединяващо патогенетично звено в изследванията на докторанта е оксидативният стрес в съчетание с провъзпалителен отговор, при който 21-аминостероидът U-74389G е теоретично обоснован като протектор. Лазароидите са обект на засилени фармакологични проучвания поради подобни на глюкокортикоидите мембранно-стабилизиращи и противовъзпалителни ефекти при отсъствие на глюкокортикоидна активност с присъщите на този клас медикаменти нежелани ефекти. Търсенето на съединения с такъв профил е съвременно издържано и определя научната стойност на дисертационния труд.

Структура и обем на дисертационния труд

Дисертационният труд е с общ обем 153 стандартни печатни страници и е структуриран съобразно възприетите изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“.

Текстът е балансирано разпределен в следните раздели: използвани съкращения (5 стр.), въведение (2 стр.), литературен обзор (49 стр.), цел, задачи, материали и методични подходи (11 стр.), резултати от проучването и обсъждане (62 стр.), изводи (2

стр.), заключение (1 стр.), научни приноси (1 стр.), библиография (16 стр.) и списък на научните публикации (1 стр.).

Дисертационният труд е прецизно и информативно онагледен с 53 фигури и 9 таблици, които логично следват обясненията в текста и позволяват добро разбиране на представените данни.

Библиографията включва 386 литературни източника, от които 3 на кирилица и 383 на латиница, като преобладават публикациите от последните десет години.

Съотношението между отделните раздели е добре разпределено, а обемът на собствените резултати и тяхното обсъждане ясно доминира над обзорната част.

Литературен обзор

Литературният обзор е задълбочен, аналитичен и последователно изграден. Трите части на прегледа представят характеристиката на лазароид U-74389G и значимите експериментални и клинични аспекти на белодробната фиброза и възпалителните заболявания на червата.

В първата част подробно са представени химическата структура, механизмът на действие, фармакокинетиката и токсичността на изследваното вещество U-74389G, както и неговите фармакологични свойства и ефекти в експериментални и клинични проучвания. Проследено е историческото развитие на този клас субстанции от първото оригинално съединение тирилазад мезилат (U-74006F). Обстойно е описан механизмът на антиоксидантно действие, свързан с улавяне на липидни пероксилни радикали, инхибиране на зависимата от желязо липидна пероксидация, вграждане в двойния липиден слой и стабилизация на мембраната чрез взаимодействие между пиперазиновия азот и фосфатните групи на мембранните липиди. Убедително е сравнението с фармакологичните свойства на метилпреднизолон, което теоретично обосновава и подкрепя изследователската идея за потенциалната роля на U-74389G като алтернатива на кортикостероидната протекция, без съпътстващи глюкокортикоид-медирани нежелани ефекти.

Втората част разглежда етиологията и честотата на идиопатичната белодробна фиброза, интерстициалната белодробна болест и хроничния хиперсензитивен пневмонит. Анализирани са патогенезата на белодробната фиброза и ролята на реактивните кислородни видове. Прецизно е разработен разделът за индуцираната от лекарства интерстициална белодробна болест и хистопатологичните модели на интерстициална пневмония, с насоченост към амиодарон, химиотерапевтични лекарства,

нитрофурантоин, антиревматични лекарства, метотрексат и биологични агенти. Д-р Кръстев компетентно и задълбочено описва съвременните експериментални модели на белодробна фиброза, включително хуманизираните модели, двуизмерните клетъчни модели, Precision-Cut Lung Slices и 3D биоинженерните модели.

Третата част разглежда възпалителните заболявания на червата (ВЗЧ) – улцерозен колит и болест на Крон, с тяхната честота и разпространение, ролята на генетичните фактори и чревната микрофлора, особеностите на вродения и адаптивния имунитет, както и значението на автофагията и редокс-баланса в чревната лигавица. Изчерпателно са класифицирани експерименталните модели на ВЗЧ, включващи химически индуцирани модели, адаптивен Т-клетъчен модел, генетично конструирани модели, IL-10 knockout модел, модели със спонтанна мутация (SAMP1/YitFc колит) и микробиом-индуцирани модели, като са обсъдени и ограниченията на всеки от тях.

В заключението към обзора докторантът аналитично аргументира избора на двата експериментални модела на хронично възпаление – амиодарон-индуцирана белодробна токсичност и DNBS-индуциран колит при плъхове, представяйки тяхната клинична значимост и литературните доказателства за възможното им приложение при тестване спектъра на действие на лазароида U-74389G.

Представената информация показва, че д-р Кръстев познава много добре литературата по темата, компетентно анализира научните факти, ясно поставя изследователски въпроси и аргументирано изгражда своята авторска позиция за необходимостта от допълнителни проучвания.

Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е формулирана ясно и точно – да се изследват ефектите на лазароида U-74389G при експериментални модели на белодробна токсичност и възпалителни заболявания на червата.

За постигане на целта са поставени 8 задачи, разпределени в две групи по четири задачи за всеки от използваните модели. Подходът при формулирането им е методологически издържан, с избор на подходящ и възпроизводим експериментален модел и последователно изследване ефектите на U-74389G върху информативни маркери за възпаление и цитотоксичност, антиоксидантна защитна система и липидна пероксидация, и хистопатологични промени.

Задачите са съответни на целта, реалистично поставени и изпълними в рамките на дисертационния труд.

Материали и методи

Материалите и методите са подробно описани и подходящо подбрани за реализиране на поставените задачи. Деклариран е произходът на експерименталните животни и са описани стандартните условия за отглеждането им.

Експериментите са проведени в Лаборатория по експериментална физиология и фармакология на катедра „Фармакология и токсикология“ при МУ – Плевен. Проучването е реализирано в съответствие с международните стандарти за грижа и използване на опитни животни (Европейска директива 2010/63/ЕС) и с националното законодателство, при разрешение за използване на животни в опити № 120/18.06.2015 г. на Българската агенция по безопасност на храните.

Използвани са общо 206 бели мъжки плъха порода Wistar с тегло 200–250 г, отглеждани при стандартизирани условия, като обемът на извършената експериментална работа е значителен и надхвърля стандартните изисквания за подобен вид дисертационен труд, което следва да се отбележи.

При модела на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност са тествани два режима на интратрахеално приложение на амиодарон – еднократно (6,25 mg/kg, 7,8 mg/ml) и двукратно на ден 0 и ден 2 (6,25 mg/kg, 3,125 mg/ml). Обосновано е избран потрудоемният двукратен режим, който осигурява възпроизводимо увреждане при по-нисък леталитет. Животните са разпределени в пет групи: контрола, амиодарон, амиодарон + U-74389G (5 mg/kg i.p. трикратно), U-74389G самостоятелно и амиодарон + преднизолон (10 mg/kg i.p.). Наличието на група с позитивен контрол (преднизолон) е съществено предимство на дизайна. Изследванията са проведени на 3, 7, 14 и 28 ден, което позволява да се проследи динамиката на възпалителен отговор и късните фибротични промени.

Приложен е широк и подходящо подбран набор от класически и съвременни методи, включващи интегрални показатели (телесна маса, тегловен коефициент на белите дробове), цитологично и биохимично изследване на бронхоалвеоларна лаважна течност (общ и диференциален брой клетки, оцветяване по Wright-Giemsa, морфологичен анализ на алвеоларните макрофаги, активност на LDH, кисела и алкална фосфатаза, общ протеин), анализ на белодробен хомогенат за активност на супероксид дисмутаза/каталаза/глутатион пероксидаза, съдържание на малонов диалдехид/плазмен хидропероксид/L-хидроксипролин/колаген, както и хистопатологично изследване на белодробна тъкан.

При модела на колит са тествани три дози на улцерогения агент DNBS – 10, 20 и 30 mg, разтворени в 0,25 ml 50% етанол и въведени интаректално. Въз основа на получените резултати е избрана дозата от 30 mg, която индуцира възпроизводим колит при всички опитни животни. Животните са разпределени в четири групи по 8: контрола, DNBS, DNBS + U-74389G (5 mg/kg i.p. за 6 дни) и DNBS + сулфасалазин (300 mg/kg p.o. за 6 дни). Използвани са клинични индикатори за активност на заболяването (телесно тегло, прием на храна и вода, консистенция на изпражненията, наличие на кръв), макроскопска оценка по критериите на Antonioli, имунологично изследване на серумните нива на IL-1, IL-6, IL-10 и TNF- α чрез ELISA, определяне на серумен малонов диалдехид и хистологично изследване. Докторантът критично анализира предимствата и ограниченията на използваните методи и убедително аргументира избора им за целите на дисертацията. Статистическият анализ на резултатите е адекватно подбран и описан. Нормалността на разпределенията е проверена с тестове на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк, използвани са Student t-тест и еднофакторен ANOVA с post hoc LSD тест, при ниво на значимост $p < 0,05$.

Резултати и обсъждане

Разделът е най-обемният в дисертационния труд и логично следва етапите на работната програма. Собствените резултати са плод на декларирана от автора оригинална научно-приложна разработка и отговарят напълно на поставените задачи. Данните ясно и точно са представени в таблици и фигури, като обсъждането следва непосредствено всяка от групите резултати.

При модела на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност е установено, че двукратното интратрахеално приложение на амиодарон предизвиква изразен ранен възпалителен отговор със значително повишаване на тегловния коефициент на белите дробове, протеиновото съдържание в бронхоалвеоларната лаважна течност (БАЛТ) – 387% спрямо контролата на 3-тия ден и общия брой клетки, и изразено нарастване на дела полиморфонуклеарни левкоцити – до 71% на 3-тия ден. Приложението на U-74389G редуцира значимо тези промени, като протеиновото съдържание намалява двукратно, а броят на полиморфонуклеарните се понижава достоверно на 3-ти, 7-ми и 28-ми ден. Размерът и морфологията на алвеоларните макрофаги при протектираните животни са близки до нормалните, докато в амиодароновата група клетките са едри, вакуолизирани, многоядрени и апоптотични, което убедително подкрепя изследователската хипотеза.

Коректно са представени и негативните резултати от проведените изследвания, изразяващи се в отсъствие на протективен ефект на U-74389G върху активността на LDH и алкалната фосфатаза в БАЛТ, които докторантът обяснява с директния цитотоксичен ефект на амиодарона, проявяващ се преди достигане на оптимална белодробна концентрация на аминостероида.

В белодробния хомогенат е наблюдавано потискане активността на супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза след третиране с амиодарон, като U-74389G смекчава тези промени. По отношение на липидната пероксидация, лазароидът достоверно намалява нивата на малонов диалдехид в белодробния хомогенат и хидропероксид в плазмата на 7-ия ден. Най-изразени са промените във фибротичните маркери, като на 14-ти и 28-ми ден U-74389G значимо понижава съдържанието на хидроксипролин и колаген в сравнение с групата само с амиодарон, като по този показател ефектът му е съпоставим с преднизолон. Биохимичните данни са потвърдени хистопатологично със значително по-слабо изразена интерстициална и перивазална фиброза на 28-ия ден.

При модела на DNBS-индуциран колит е доказан комплексен протективен ефект на U-74389G. Лазароидът значително подобрява клиничните индикатори за активност на заболяването, включващи телесно тегло, прием на храна и диаричен индекс. По отношение на макроскопските показатели, язвеният индекс намалява от $3,87 \pm 0,61$ в DNBS групата до $1,25 \pm 0,25$, а общата макроскопска оценка на увреждане на дебелото черво се понижава от $5,7 \pm 0,74$ до $1,625 \pm 0,41$. Имунологичните изследвания показват значимо намаляване на серумните нива на TNF- α , IL-1 и IL-6 и достоверно повишаване на противовъзпалителния IL-10. Доказателство за антиоксидантния ефект при DNBS-индуцирания колит са серумните нива на малонов диалдехид, които, след третиране с U-74389G, се нормализират до стойности, статистически неразличими от контролните. Хистологичното изследване потвърждава клиничните и биохимичните данни, като установява значително намалени мукозна некроза, кръвоизлив, клетъчна инфилтрация и оток, с данни за частично възстановяване на архитектурата на лигавицата.

В обсъждането докторантът съпоставя собствените си резултати с данни на други автори, като задълбочено търси и обосновава причините за приликите и различията. По-слабо изразения ефект на сулфасалазина коректно е обяснен с необходимостта от по-продължителен от приложения в дисертацията протокол за изява на терапевтичното действие. Механизмите на действие на 21-аминостероидите, свързани с мембранна стабилизация, улавяне на пероксилни радикали, инхибиране на каспаза-1, както и

миграцията и активирането на възпалителните клетки, са добре обосновани в дискусията и са обвързана с представените експериментални данни.

Изводи и заключение

Въз основа на получените резултати са формулирани 13 извода, разпределени в две групи по 7 за модела на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност и 6 за модела на DNBS-индуциран колит. Изводите са формулирани прецизно, съответстват точно на поставените задачи, произтичат от получените данни и отразяват най-съществените резултати. Заключението обобщава сполучливо резултатите от двата експериментални модела и предлага удачна финална интерпретация на наблюдаваните ефекти.

Научни приноси

Д-р Кръстев е формулирал 7 приноса, от които 4 с оригинален характер и 3 с потвърдителен и научно-приложен характер. Счита, че те реално и аналитично отразяват постигнатите резултати.

Съществени авторски приноси с оригинален характер са систематичното сравнение на ефикасността на U-74389G и преднизолон при амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове, изследването на ефекта на U-74389G в DNBS-индуциран модел на колит при плъхове с демонстриран комплексен клиничен, макроскопски, имунологичен, антиоксидантен и хистологичен протективен ефект, установеното нормализиране на серумните нива на малонов диалдехид при DNBS-индуциран колит под действие на U-74389G, както и документирането на значимо потискане на провъзпалителните цитокини TNF- α , IL-1 β и IL-6 и повишаване на IL-10.

С потвърдителен и научно-приложен характер са приносите, свързани с доказване удачността по отношение на ефикасност и безопасност на избрания модел с двукратно интратрахеално приложение на амиодарон и установяване на оптималната доза DNBS 30 mg интаректално за индуциране на възпроизводим колит при плъхове порода Wistar. Тези приноси имат пряка практическа стойност за планирането на бъдещи предклинични фармакологични изследвания.

Публикации и научна активност

Във връзка с дисертационния труд д-р Кръстев е представил 3 научни публикации, в две от които е първи автор. Две статии са публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Scopus, Web of Science), а една – в нереферирано издание с научно рецензиране. В представената

авторска справка, публикационната активност по показател Г от минималните национални изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“ в професионално направление 7.1. Медицина е 45 точки, с което д-р Кръстев покрива и надхвърля нормативно изискуемите минимум 30 т. Резултатите са докладвани и на VIII Национален конгрес по фармакология, клинична фармакология и терапия с международно участие в МУ – Плевен, 15-17 ноември 2024 г.

Автореферат

Авторефератът е изготвен съобразно изискванията, посочени в нормативните документи на МУ – Плевен. Включени са всички задължителни раздели, които коректно и в достатъчна пълнота отразяват структурата, съдържанието, основните резултати, изводите и приносите на дисертационния труд.

Текстът е онагледен с 53 фигури и 9 таблици, съответстващи на представените в дисертационния труд. Приложен е списък на научните публикации, свързани с дисертацията.

Заключение

Дисертационният труд на д-р Пламен Красимиров Кръстев на тема „Ефекти на U-74389G в експериментални модели на белодробна токсичност и колит при плъхове“ е актуален, с ясно формулирана цел, коректно поставени задачи и значителен по обем и качество експериментален материал.

Разработката съдържа оригинални научни и научно-приложни приноси и представлява лично дело на докторанта. Наукометричните показатели съответстват на изискванията за присъждане на ОНС „Доктор“, заложи в ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Правилника за развитие на академичния състав на МУ – Плевен.

Д-р Кръстев е овладял съвременни методики за експериментална работа, показва задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“, умее да работи в екип и притежава качества за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Въз основа на гореизложеното, давам категорично положителна оценка на дисертационния труд и цялостната научноизследователска дейност на докторанта и убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждането на образователна и научна степен „Доктор“ на д-р Пламен

Красимиров Кръстев в докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“, професионално направление 7.1. Медицина, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

28. 08. 2026 г.

Изготвил рецензията:

гр. Плевен

/доц. д-р Диана Пендичева-Духленска, д.м./

**TO THE CHAIRPERSON OF THE SCIENTIFIC JURY,
APPOINTED BY ORDER No. 2381/28.07.2026
OF THE RECTOR OF MU – PLEVEN**

R E V I E W

by Assoc. Prof. Diana Ilieva Pendicheva-Duhlena, MD, PhD
Head of the Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy,
Medical University – Pleven

Subject: Dissertation for the award of the educational and scientific degree “Doctor” in the field of higher education 7. Health Care and Sports, professional field 7.1. Medicine, doctoral programme “Pharmacology (incl. Pharmacokinetics and Chemotherapy)”.

Author: Plamen Krasimirov Krastev, MD

Form of doctoral studies: independent doctoral study

Department: Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, MU – Pleven

Title: “Effects of U-74389G in experimental models of pulmonary toxicity and colitis in rats”

Academic supervisors: Prof. Galya Tsvetanova Stavreva-Marinova, MD, PhD, and Assoc. Prof. Violeta Yordanova Dancheva, MD, PhD

By Order No. 2381/28.07.2026 of the Rector of the Medical University – Pleven, I was appointed a member of the Scientific Jury in the procedure for the award of the educational and scientific degree “Doctor” to Plamen Krasimirov Krastev, MD. At the first non-attendance meeting of the Scientific Jury, held on 1 August 2026, I was assigned to prepare a review of the submitted dissertation.

General presentation of the procedure

All documents and materials submitted electronically comply with the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADASRB), the Regulations for its implementation, and the Rules for the Development of the Academic Staff of the Medical University – Pleven (2022). The set of materials is correctly and completely arranged, which facilitates the tracing of the procedure carried out.

No violations of the procedural requirements have been committed. I have found no evidence of plagiarism in the dissertation submitted to me for evaluation.

I hereby declare that I have no conflict of interest with the candidate within the meaning of the applicable legal framework.

Brief biographical data and professional development

Dr. Plamen Krasimirov Krastev was born on 29 December 1969 in the town of Pleven. In 1987 he graduated from the “Geo Milev” Mathematics High School – Pleven. He obtained his master’s degree in medicine at the Higher Medical Institute – Pleven in 1995 (Diploma No. 003057/20.11.1995). In 2003 he also obtained a master’s degree in finance at the Veliko Tarnovo University (Diploma series VTU 2003, reg. No. 12718/2003). He holds two medical specialties – Aviation Medicine (Military Medical Academy – Sofia, 2000) and General Medicine (Certificate series VMI 2002, No. 0883).

Dr. Krastev began his professional career in the military medical service: he was Head of the Medical Service of Military Unit 38960 in the village of Telish (October 1996–July 2002); a resident physician at the medical post of the “Hristo Botev” Training Base – Pleven (July 2002–June 2005); Deputy Head of the medical post of Military Unit 24870 in the village of Kamenets (June 2005–May 2007); and Deputy Head of the medical post of Military Formation 52090 in Dolna Mitropolia (June 2007– March 2015|).

Following a successful competition, in September 2015 Dr. Krastev was appointed Assistant Professor at the Department of Pharmacology and Toxicology of the Medical University – Pleven, where he is currently a lecturer and participates in the practical training of medical students at the Faculty of Medicine and of students in the Nursing programme at the Medical College.

Dr. Krastev has an excellent written and spoken command of English and Russian. In order to enhance his qualification, he has completed training in “Health Management for Managers of Healthcare Establishments”, as well as the “Captain’s Career Course” for the career development of senior medical personnel in the armed forces of the USA, conducted at the “Lackland AFB” and “Fort Sam Houston” military bases in San Antonio, Texas (02.2010 – 09.2010). The doctoral candidate possesses very good computer and design skills, which are also evident in the high-quality graphic presentation of the dissertation.

Relevance of the problem under study

The subject of the dissertation is relevant and timely and concerns two socially significant groups of diseases – interstitial lung diseases with an outcome of pulmonary fibrosis, and inflammatory bowel diseases. Both conditions permanently impair quality of life, are difficult to diagnose and treat, while the available therapy is predominantly pathogenetic, costly

and associated with a risk of adverse drug reactions upon prolonged administration, which places a significant emphasis on the need for contemporary scientific research in this direction.

Drug-induced interstitial lung disease is a serious clinical problem with growing evidence from studies of medicinal products potentially associated with its development, including monoclonal antibodies, biological products, chemotherapeutic agents, immune checkpoint inhibitors, antibiotics, antiarrhythmics and other modern therapies.

Amiodarone is among the classic and clinically significant causes of pulmonary toxicity, which makes the choice of an amiodarone-induced experimental model in the laboratory animals studied by the doctoral candidate purposeful and appropriate. Inflammatory bowel diseases likewise show an increasing incidence, including in low- and middle-income countries, and at present have no aetiological treatment.

The unifying pathogenetic link in the doctoral candidate's research is oxidative stress combined with a pro-inflammatory response, in which the 21-aminosteroid U-74389G is theoretically substantiated as a protective agent. Lazaroids are the subject of intensified pharmacological research owing to their glucocorticoid-like membrane-stabilising and anti-inflammatory effects in the absence of glucocorticoid activity with the adverse effects inherent to this class of medicinal products. The search for compounds with such a profile is scientifically sound in contemporary terms and determines the scientific value of the dissertation.

Structure and volume of the dissertation

The dissertation has a total volume of 153 standard printed pages and is structured in accordance with the accepted requirements for the award of the educational and scientific degree "Doctor".

The text is well balanced across the following sections: abbreviations used (5 pp.), introduction (2 pp.), literature review (49 pp.), aim, objectives, materials and methodological approaches (11 pp.), results of the study and discussion (62 pp.), conclusions (2 pp.), summary conclusion (1 p.), scientific contributions (1 p.), bibliography (16 pp.) and list of scientific publications (1 p.).

The dissertation is precisely and informatively illustrated with 53 figures and 9 tables, which follow the explanations in the text logically and allow a good understanding of the data presented.

The bibliography comprises 386 literature sources, of which 3 in Cyrillic and 383 in Latin script, with publications from the last ten years predominating.

The proportion between the individual sections is well distributed, and the volume of the candidate's own results and their discussion clearly predominates over the review part.

Literature review

The literature review is in-depth, analytical and consistently constructed. The three parts of the review present the characteristics of the lazard U-74389G and the significant experimental and clinical aspects of pulmonary fibrosis and inflammatory bowel diseases.

The first part presents in detail the chemical structure, mechanism of action, pharmacokinetics and toxicity of the investigated substance U-74389G, as well as its pharmacological properties and effects in experimental and clinical studies. The historical development of this class of substances is traced from the first original compound, tirilazad mesylate (U-74006F). The mechanism of antioxidant action is described comprehensively, related to the scavenging of lipid peroxy radicals, inhibition of iron-dependent lipid peroxidation, incorporation into the lipid bilayer and membrane stabilisation through interaction between the piperazine nitrogen and the phosphate groups of the membrane lipids. The comparison with the pharmacological properties of methylprednisolone is convincing and provides theoretical substantiation and support for the research idea concerning the potential role of U-74389G as an alternative to corticosteroid protection, without the accompanying glucocorticoid-mediated adverse effects.

The second part examines the aetiology and incidence of idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung disease and chronic hypersensitivity pneumonitis. The pathogenesis of pulmonary fibrosis and the role of reactive oxygen species are analysed. The section on drug-induced interstitial lung disease and the histopathological pattern of interstitial pneumonia is precisely developed, with a focus on amiodarone, chemotherapeutic drugs, nitrofurantoin, antirheumatic drugs, methotrexate and biological agents. Dr. Krastev describes competently and thoroughly the contemporary experimental models of pulmonary fibrosis, including humanised models, two-dimensional cell models, Precision-Cut Lung Slices and 3D bioengineered models.

The third part examines inflammatory bowel diseases (IBD) – ulcerative colitis and Crohn's disease – with their incidence and prevalence, the role of genetic factors and of the intestinal microflora, the features of innate and adaptive immunity, as well as the significance of autophagy and of the redox balance in the intestinal mucosa. The experimental models of IBD are exhaustively classified, including chemically induced models, the adaptive T-cell model, genetically engineered models, the IL-10 knockout model, models with spontaneous mutation (SAMP1/YitFc colitis) and microbiome-induced models, with the limitations of each of them also being discussed.

In the concluding part of the review, the doctoral candidate analytically substantiates the choice of the two experimental models of chronic inflammation – amiodarone-induced pulmonary toxicity and DNBS-induced colitis in rats – presenting their clinical significance and the literature evidence for their possible application in testing the spectrum of action of the lazaroïd U-74389G.

The information presented demonstrates that Dr. Krastev has a very good command of the literature on the topic, competently analyses the scientific facts, clearly formulates research questions and builds his own authorial position on the need for further studies in a well-argued manner.

Aim and objectives

The aim of the dissertation is formulated clearly and precisely – to investigate the effects of the lazaroïd U-74389G in experimental models of pulmonary toxicity and inflammatory bowel diseases.

To achieve this aim, 8 objectives have been set, distributed in two groups of four objectives for each of the models used. The approach to their formulation is methodologically sound, involving the selection of an appropriate and reproducible experimental model and the consistent investigation of the effects of U-74389G on informative markers of inflammation and cytotoxicity, on the antioxidant defence system and lipid peroxidation, and on histopathological changes.

The objectives correspond to the aim, are realistically set and feasible within the framework of the dissertation.

Materials and methods

The materials and methods are described in detail and are appropriately selected for the implementation of the objectives set. The origin of the experimental animals is declared and the standard conditions for their housing are described.

The experiments were carried out in the Laboratory of Experimental Physiology and Pharmacology at the Department of Pharmacology and Toxicology of the Medical University – Pleven. The study was conducted in accordance with the international standards for the care and use of laboratory animals (European Directive 2010/63/EU) and with national legislation, under Permit for the use of animals in experiments No. 120/18.06.2015 of the Bulgarian Food Safety Agency.

Two hundred and six white male Wistar rats weighing 200–250 g were used, housed under standardised conditions; the volume of experimental work performed is considerable and exceeds the standard requirements for a dissertation of this kind, which should be noted.

In the model of amiodarone-induced pulmonary toxicity, two regimens of intratracheal administration of amiodarone were tested – a single administration (6.25 mg/kg, 7.8 mg/ml) and a two-dose administration on day 0 and day 2 (6.25 mg/kg, 3.125 mg/ml). The more laborious two-dose regimen, which ensures reproducible injury with lower lethality, was selected on well-founded grounds. The animals were allocated to five groups: control, amiodarone, amiodarone + U-74389G (5 mg/kg i.p., three times), U-74389G alone, and amiodarone + prednisolone (10 mg/kg i.p.). The presence of a positive control group (prednisolone) is a substantial advantage of the design. The examinations were carried out on days 3, 7, 14 and 28, which makes it possible to follow the dynamics of the inflammatory response and the late fibrotic changes.

A broad and appropriately selected set of classical and contemporary methods was applied, including integral indicators (body weight, lung weight coefficient), cytological and biochemical examination of bronchoalveolar lavage fluid (total and differential cell count, Wright-Giemsa staining, morphological analysis of alveolar macrophages, activity of LDH, acid and alkaline phosphatase, total protein), analysis of lung homogenate for the activity of superoxide dismutase/catalase/glutathione peroxidase, content of malondialdehyde/plasma hydroperoxide/L-hydroxyproline/collagen, as well as histopathological examination of lung tissue.

In the colitis model, three doses of the ulcerogenic agent DNBS were tested – 10, 20 and 30 mg, dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol and administered intrarectally. Based on the results obtained, the dose of 30 mg was selected, which induces reproducible colitis in all experimental animals. The animals were allocated to four groups of 8: control, DNBS, DNBS + U-74389G (5 mg/kg i.p. for 6 days) and DNBS + sulfasalazine (300 mg/kg p.o. for 6 days). Clinical indicators of disease activity were used (body weight, food and water intake, stool consistency, presence of blood), macroscopic assessment according to the criteria of Antonioli, immunological examination of the serum levels of IL-1, IL-6, IL-10 and TNF- α by ELISA, determination of serum malondialdehyde, and histological examination. The doctoral candidate critically analyses the advantages and limitations of the methods used and convincingly substantiates their selection for the purposes of the dissertation. The statistical analysis of the results is adequately chosen and described. The normality of the distributions was verified with the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests; Student's t-test and one-way ANOVA with a post hoc LSD test were used, at a significance level of $p < 0.05$.

Results and discussion

This section is the most extensive in the dissertation and logically follows the stages of the work programme. The candidate's own results are the product of an original scientific and applied study declared by the author and fully correspond to the objectives set. The data are presented clearly and accurately in tables and figures, with the discussion following immediately after each group of results.

In the model of amiodarone-induced pulmonary toxicity, it was established that the two-dose intratracheal administration of amiodarone provokes a pronounced early inflammatory response with a significant increase in the lung weight coefficient, in the protein content of the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) – 387% relative to the control on day 3 – and in the total cell count, together with a marked increase in the proportion of polymorphonuclear leukocytes, reaching 71% on day 3. The administration of U-74389G significantly reduces these changes: the protein content decreases twofold, and the number of polymorphonuclear leukocytes is significantly lower on days 3, 7 and 28. The size and morphology of the alveolar macrophages in the protected animals are close to normal, whereas in the amiodarone group the cells are large, vacuolated, multinucleated and apoptotic, which convincingly supports the research hypothesis.

The negative results of the studies performed are also correctly presented, consisting in the absence of a protective effect of U-74389G on the activity of LDH and alkaline phosphatase in BALF, which the doctoral candidate explains by the direct cytotoxic effect of amiodarone, manifested before an optimal pulmonary concentration of the aminosteroid is reached.

In the lung homogenate, suppression of the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase was observed after treatment with amiodarone, with U-74389G mitigating these changes. Regarding lipid peroxidation, the lazaroid significantly reduces the levels of malondialdehyde in the lung homogenate and of hydroperoxide in the plasma on day 7. The changes in the fibrotic markers are most pronounced: on days 14 and 28, U-74389G significantly lowers the content of hydroxyproline and collagen compared with the amiodarone-only group, its effect on this indicator being comparable to that of prednisolone. The biochemical data are confirmed histopathologically by a markedly less pronounced interstitial and perivascular fibrosis on day 28.

In the model of DNBS-induced colitis, a complex protective effect of U-74389G has been demonstrated. The lazaroid significantly improves the clinical indicators of disease activity, including body weight, food intake and diarrhoea index. Regarding the macroscopic indicators, the ulceration index decreases from 3.87 ± 0.61 in the DNBS group to 1.25 ± 0.25 , and the overall macroscopic score of colonic damage falls from 5.7 ± 0.74 to 1.625 ± 0.41 . The immunological examinations show a significant reduction in the serum levels of TNF- α , IL-1

and IL-6 and a significant increase in the anti-inflammatory IL-10. Evidence of the antioxidant effect in DNBS-induced colitis is provided by the serum levels of malondialdehyde, which, after treatment with U-74389G, are normalised to values statistically indistinguishable from those of the controls. The histological examination confirms the clinical and biochemical data, establishing significantly reduced mucosal necrosis, haemorrhage, cellular infiltration and oedema, with evidence of partial restoration of the architecture of the mucosa.

In the discussion, the doctoral candidate compares his own results with data from other authors, thoroughly seeking and substantiating the reasons for the similarities and differences. The less pronounced effect of sulfasalazine is correctly explained by the need for a protocol longer than the one applied in the dissertation for its therapeutic action to become manifest. The mechanisms of action of the 21-aminosteroids, related to membrane stabilisation, scavenging of peroxy radicals, inhibition of caspase-1, as well as of the migration and activation of inflammatory cells, are well substantiated in the discussion and are linked to the experimental data presented.

Conclusions and summary conclusion

Based on the results obtained, 13 conclusions have been formulated, distributed in two groups – 7 for the model of amiodarone-induced pulmonary toxicity and 6 for the model of DNBS-induced colitis. The conclusions are precisely formulated, correspond exactly to the objectives set, derive from the data obtained and reflect the most essential results. The summary conclusion successfully synthesises the results of the two experimental models and offers an apt final interpretation of the effects observed.

Scientific contributions

Dr. Krastev has formulated 7 contributions, of which 4 are of an original nature and 3 of a confirmatory and applied scientific nature. I consider that they realistically and analytically reflect the results achieved.

Essential authorial contributions of an original nature are the systematic comparison of the efficacy of U-74389G and prednisolone in amiodarone-induced pulmonary toxicity in rats; the investigation of the effect of U-74389G in a DNBS-induced model of colitis in rats, with a demonstrated complex clinical, macroscopic, immunological, antioxidant and histological protective effect; the established normalisation of the serum levels of malondialdehyde in DNBS-induced colitis under the action of U-74389G; as well as the documented significant suppression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 and the increase in IL-10.

Of a confirmatory and applied scientific nature are the contributions related to demonstrating the appropriateness, in terms of efficacy and safety, of the selected model with two-dose intratracheal administration of amiodarone, and to establishing the optimal dose of DNBS – 30 mg intrarectally – for inducing reproducible colitis in Wistar rats. These contributions have direct practical value for the planning of future preclinical pharmacological studies.

Publications and scientific activity

In connection with the dissertation, Dr. Krastev has submitted 3 scientific publications, in two of which he is the first author. Two of the articles have been published in scientific journals referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information (Scopus, Web of Science), and one in a non-referenced journal with scientific peer review. According to the author's reference submitted, the publication activity under indicator G of the minimum national requirements for the award of the educational and scientific degree "Doctor" in professional field 7.1. Medicine amounts to 45 points, whereby Dr. Krastev meets and exceeds the statutorily required minimum of 30 points. The results have also been reported at the VIII National Congress of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Therapeutics with international participation, Medical University – Pleven, 15–17 November 2024.

Author's abstract

The author's abstract has been prepared in accordance with the requirements set out in the normative documents of the Medical University – Pleven. All mandatory sections have been included, which correctly and with sufficient completeness reflect the structure, content, main results, conclusions and contributions of the dissertation.

The text is illustrated with 53 figures and 9 tables corresponding to those presented in the dissertation. A list of the scientific publications related to the dissertation is appended.

Conclusion

The dissertation of Dr. Plamen Krasimirov Krastev on the topic "Effects of U-74389G in experimental models of pulmonary toxicity and colitis in rats" relevant, with a clearly formulated aim, correctly set objectives and experimental material that is considerable in both volume and quality.

The work contains original scientific and applied scientific contributions and constitutes the personal work of the doctoral candidate. The scientometric indicators correspond to the requirements for the award of the educational and scientific degree "Doctor" laid down in the

ADASRB, the Regulations for its implementation and the Rules for the Development of the Academic Staff of the Medical University – Pleven.

Dr. Krastev has mastered contemporary methods of experimental work, demonstrates in-depth theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty “Pharmacology (incl. Pharmacokinetics and Chemotherapy)”, is able to work in a team and possesses the qualities required for the independent conduct of scientific research.

On the basis of the above, I give a categorically positive assessment of the dissertation and of the overall research activity of the doctoral candidate, and I confidently recommend to the esteemed members of the Scientific Jury to vote in favour of awarding the educational and scientific degree “Doctor” to Dr. Plamen Krasimirov Krastev in the doctoral programme “Pharmacology (incl. Pharmacokinetics and Chemotherapy)”, professional field 7.1. Medicine, field of higher education 7. Health Care and Sports.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

28.08.2026

Reviewer:

Pleven

/Assoc. Prof. Diana Pendicheva-Duhlenka, MD, PhD/