

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Стефан Тодоров Сивков, дм
Катедра по анатомия, хистология, цитология и биология
Медицински университет-Плевен

Относно: дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор” в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, Докторска програма: „Анатомия, хистология и цитология”

Автор: д-р Десислава Маринова Маринова

Тема: „Проучване експресията на получените чрез алтернативния сплайсинг иРНК варианти на холинацетилтрансферазата в ентeралната нервна система на мишка”

Научен ръководител: Доц. д-р Стефан Трифонов, доктор (Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология, Медицински университет-Плевен),

1. **Общо представяне на процедурата и докторанта.** Със заповед № 4059/28.10.2025 г. на Ректора на Медицински университет – Плевен съм определен за член на научното жури във връзка с процедурата за защита на дисертационния труд на тема „**Проучване експресията на получените чрез алтернативния сплайсинг иРНК варианти на холинацетилтрансферазата в ентeралната нервна система на мишка**” за придобиване на ОНС „Доктор” в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, Докторска програма: „Анатомия, хистология и цитология”. Автор на дисертационния труд е д-р Десислава Маринова Маринова – редовен докторант към Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология, Медицински университет-Плевен с научен ръководител доц. д-р Стефан Трифонов. За изготвяне на рецензията получих материалите, изискващи се от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени заемане на академични длъжности в Медицински университет-Плевен.

Докторантката Десислава Маринова Маринова е родена в гр. Плевен, където завършва средното си образование. През 2000 г. завършва образованието си в Медицински университет-Плевен, Факултет по медицина с магистърска специалност „Лекар”.

От 2001 до 2004 г. работи като лекар в ЦСМП гр. Козлодуй. От 2004 до 2009 е специализирала по специалността „Анатомия, хистология и цитология“ в Катедра

„Анатомия, хистология, цитология и биология“ на Медицински университет-Плевен. През 2008 г. получава специалност по „Анатомия, хистология и цитология“.

През 2019 г. е зачислена (Заповед № 862/29.03.2019) за редовен докторант по докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“, в Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ на Медицински университет-Плевен. През 2024 г. е отчислена от докторантура с право на защита (Заповед № 1316/13.05.2024 г.).

2. Актуалност на темата. Ентералната нервна система е известна като съвкупност от неврони, която формира административния център на храносмилателния тракт. Тя контролира моториката, екзокринните и ендокринните функции и микроциркулацията на храносмилателната система; организира имунорегулаторни и възпалителни процеси. Наред с храносмилателните си функции, ентералната нервна система придобива значение и поради откриването на нейната двупосочна връзка с чревната флора, която напоследък започва да се разглежда като отделен орган, зависим от храносмилателните си функции. Дисертацията е посветена на изследването на хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт и експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима холинацетилтрансферазата (ChAT) в храносмилателен тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl.

3. Познаване на проблема. Уводът, приведените основни сведения за невронна структура в стената на храносмилателния тракт, връзката с аферентните и еферентните влакна на автономната нервна система, невротрансмитерите, сплайсинг вариантите на ChAT наред с творческото използване на цитирания литературен материал показват познаване на състоянието на проблема, третиран в дисертацията от докторантката.

4. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите. Дисертационният труд е структуриран според общоприетите изисквания - въведение, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи. Представен е на 126 страници и е онагледен с 5 таблици и 33 фигури. Цитирани са 270 литературни източника.

В **Литературния обзор** е направен исторически преглед на проблема, като са анализирани резултатите на редица автори за морфологичните характеристики на ентералната нервна система. Приведени са данни от научната литература за микробиома в стомашно-чревния тракт, който играе ключова роля за нормалното протичане на основни жизненоважни физиологични процеси. Направен е преглед на данните за невротрансмитерите и холинергичната медиация в ентералната нервна система при реализирането на моторните, секреторните, вътрешните сетивни и съдовите рефлексии. Проследени са изследванията върху холинацетилтрансферазата, който е ключов ензим в биосинтезата на ацетилхолин и ролята на алтернативния сплайсинг в експресията на гена, кодиращ ензима за синтеза на ацетилхолин.

Направеният анализ на прегледаната специализирана литература показва актуалността и значимостта на регулаторните характеристики на ентералната нервна система

осъществявани в тясна връзка с невротрансмитерите, което е дало основание на докторантката да формулира целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

Целта на настоящото проучване е да се проучат хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт и експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT в храносмилателен тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl. За реализирането на целта докторантката си е поставила осем задачи, включващи определяне на нуклеотидната последователност на сплайсинг вариантите на ChAT в ентералната нервна система, изработване на дизайн на специфичен набор от праймери за сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT и количествен PCR със специфичните праймерни двойки за всеки сплайсинг вариант .

Материалът на изследването е достатъчен по обем, правилно избран и структуриран, добре документиран и прецизно регистриран, което гарантира достоверност на резултатите.

Методика на изследването. Използвани са експериментални мишки от мъжки пол от порода C57Bl/6NCrl на възраст между 9 и 11 седмица. Изработени са хистологични препарати за светлинно-микроскопско изследване; изработени са праймерни двойки насочени към сплайсинг вариантите на иРНК на ензима холинацетилтрансфераза; извършена е PCR амплификация на изследваните сплайсинг варианти и синтез на комплементарна ДНК. Статистическите методи са подходящо избрани с информативност необходима за изследването. Извършена е статистическа обработка на данните с помощта на One-way ANOVA, последван от множествен пост-хок тест по Tukey.

Резултати. Резултатите от изследването са нагледно демонстрирани и анализирани в представената документация (графики и таблици). Данните от настоящото изследване, представят хистологичните особености на стената на храносмилателния тракт при мишки от порода C57Bl/6NCrl, използвайки техниката Swiss roll. Ясно се визуализира plexus myentericus с вариации по размер, форма и ориентация в различните отдели на храносмилателния тракт миентерални ганглии. Подлигавичното сплетение е представя с по-малки по размер ганглии, пръснати сред съединителната тъкан на слоя.

С проведения генетичен анализ докторантката установява експресия на сплайсинг вариантите M, cChAT и pChAT, което предполага наличие на различни транскрипционни форми на ензима в ентералната чревния тракт. Съпътстващата експресия на тези три изоформи предполага функционална хетерогенност на холинергичните неврони в храносмилателния тракт и вероятно различна роля на всяка от формите в регулацията на моторната и секреторната активност.

Използван е относителен количествен анализ чрез qPCR за представяне на нивата на експресия на изследваните сплайсинг варианти в различните отдели на гастроинтестиналния тракт без абсолютното им количествено измерване. Това позволява да се оценят тъканно-специфичните разлики в експресията на сплайсинг

вариантите на ChAT в контекста на функционалните особености на отделните участъци от храносмилателния тракт.

Изводите обобщават вярно резултатите от изследването. Очертана е съществената роля на холинергичната система в медирането на чревната моторика, емоционалното поведение, когнитивните процеси. Надежден маркер за визуализация на холинергичните структури е ензима ChAT. В проучването се установява експресия на M, cChAT и pChAT вариантите на ензима в ентералната нервна система по хода на мишия храносмилателен тракт. Изтъква се наличието на множество сплайсинг варианти на иРНК за ChAT, което увеличава кодиращия потенциал на генома и функционалното разнообразие на синтезираните белтъци.

Преценка на публикациите и личния принос на докторанта. Основните резултати от дисертацията са публикувани в три публикации в **реферирани и индексирани** в Scopus и Web of Science списания – една в Journal of Biomedical and Clinical Research (2024) и две в Journal of IMAV (2022). Представени са и две публикации в **нереферирани списания с научно рецензиране**. Публикациите са в съавторство, но в повечето докторантът е водещ автор, което ми дава основание да смятам, че има основен принос в резултатите. Представена е справка за три цитирания в чуждестранни списания на една публикация. Има и четири съобщения на научни форуми, както и един реализиран вътреуниверситетски проект по темата на дисертацията.

Авторефератът е структуриран правилно, като отразява съдържанието, основните резултати и приносите на дисертационния труд.

Препоръките ми за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати са за прилагането им в по-нататъшното изучаване и разширяване на тази проблематика, при което получените резултати да се публикуват и в самостоятелни научни статии. Това би допринесло за по-пълното разбиране на посттранскрипционната регулация на ChAT и ролята на ензима в нормалната и патологична функция на холинергичната сигнализация в ентералната нервна система.

Заклучение. Дисертационният труд на д-р Десислава Маринова разглежда проблем, който е с научен и практически интерес в областта на морфологичните науки. Получени са научни резултати, обогатяващи познанията с нови и осъвременени данни за хистологичните характеристики и експресията на сплайсинг вариантите на иРНК на ензима ChAT на храносмилателния тракт на мишки. Авторката провежда оригинално целенасочено проучване за оценка експресия на сплайсинг вариантите M, cChAT и pChAT, което предполага наличие на различни транскрипционни форми на ензима в ентералната чревния тракт. Това е реален научен принос. Изложението и оформлението на дисертационния труд и на автореферата е много добро. Извършена е голяма по обем и трудна за изпълнение работа. Това показва, че докторантът притежава теоретични знания и професионални умения по научната специалност, както и умения за самостоятелни научни изследвания. Представените материали и документи по процедурата отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния

състав в Република България, Правилника за прилагане на този закон, Регламента за придобиване на ОНС „Доктор” в Медицински университет-Плевен..

Въз основа на изложеното давам положителна оценка за проведеното научно изследване в дисертационния труд, като предлагам на почитаемото научно жури да присъди на д-р Десислава Маринова Маринова образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, Докторска програма: „Анатомия, хистология и цитология”

Проф. д-р Стефан Сивков, дм **На основание чл.59 от ЗЗЛД**

11.11.2025 г.

REVIEW

by Prof. Dr. Stefan Todorov Sivkov, MD

Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology

Medical University-Pleven

Subject: Dissertation for awarding the educational and scientific degree "Doctor" in the field of higher education: 7. Health and Sport, professional field 7.1 Medicine, scientific specialty "Anatomy, Histology and Cytology"

Author: Desislava Marinova Marinova, MD

Topic: "Study of the expression of choline acetyltransferase mRNA alternative splicing isoforms in the mouse enteric nervous system"

Scientific supervisor: Assoc. Prof. Dr. Stefan Trifonov, Doctor (Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Medical University-Pleven),

1. General presentation of the procedure and the doctoral student. By order No. 4059/28.10.2025 of the Rector of the Medical University - Pleven, I have been appointed as a member of the scientific jury in connection with the procedure for the defense of the dissertation on the topic "Study of the expression of the mRNA variants of cholineacetyltransferase obtained through alternative splicing in the enteric nervous system of a mouse" for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor" in the field of higher education 7. Health and Sport, professional field 7.1 Medicine, scientific specialty "Anatomy, Histology and Cytology". The author of the dissertation is Dr. Desislava Marinova Marinova - a full-time doctoral student at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Medical University-Pleven, with scientific supervisor Assoc. Prof. Dr. Stefan Trifonov, Doctor (Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Medical University-Pleven). To prepare the review, I received the materials required by the Regulations on the conditions and procedure for acquiring scientific degrees and holding academic positions at the Medical University-Pleven.

The doctoral student Desislava Marinova Marinova was born in the city of Pleven, where she completed her secondary education. In 2000, she completed her education at the Medical University-Pleven, Faculty of Medicine with a master's degree in "Physician".

From 2001 to 2004, she worked as a doctor at the Kozloduy Central Emergency Center. From 2004 to 2009, she specialized in the specialty "Anatomy, Histology and Cytology" at the Department of "Anatomy, Histology, Cytology and Biology" of the Medical University of Pleven. In 2008, she received a specialty in "Anatomy, Histology and Cytology".

In 2019, she was enrolled (Order No. 862/29.03.2019) as a full-time doctoral student in the doctoral program "Anatomy, Histology and Cytology", at the Department of "Anatomy, Histology, Cytology and Biology" of the Medical University of Pleven. In 2024, she was dismissed from doctoral studies with the right to defend her thesis (Order No. 1316/13.05.2024).

2. Relevance of the topic. The enteric nervous system is known as a collection of neurons that forms the administrative center of the digestive tract. It controls motility, exocrine and endocrine functions and microcirculation of the digestive system; organizes immunoregulatory and inflammatory processes. Along with its digestive functions, the enteric nervous system also gains importance due to the discovery of its bidirectional connection with the intestinal flora, which has recently begun to be considered as a separate organ dependent on its digestive functions. The dissertation is devoted to the study of the histological structure of the digestive tract wall and the expression of splicing variants of the mRNA of the choline acetyltransferase enzyme (ChAT) in the digestive tract of C57Bl/6NCrl mice.

3. Knowledge of the problem. The introduction, the basic information provided about the neuronal structure in the wall of the digestive tract, the connection with the afferent and efferent fibers of the autonomic nervous system, the neurotransmitters, the splicing variants of ChAT, along with the creative use of the cited literary material, demonstrate knowledge of the state of the problem treated in the dissertation by the doctoral student.

4. Characteristics and evaluation of the dissertation work and contributions. The dissertation work is structured according to generally accepted requirements - introduction, literature review, aim and objectives, material and methods, results, discussion, conclusions. It is presented on 126 pages and is illustrated with 5 tables and 33 figures. 270 literary sources are cited.

The Literature Review provides a historical overview of the problem, analyzing the results of a number of authors on the morphological characteristics of the enteric nervous system. Data from the scientific literature on the microbiome in the gastrointestinal tract, which plays a key role in the normal course of basic vital physiological processes, are provided. A review of the data on neurotransmitters and cholinergic mediation in the enteric nervous system in the implementation of motor, secretory, internal sensory and vascular reflexes was conducted. Research on choline acetyltransferase, which is a key enzyme in the biosynthesis of acetylcholine and the role of alternative splicing in the expression of the gene encoding the enzyme for the synthesis of acetylcholine, was monitored.

The analysis of the reviewed specialized literature showed the relevance and significance of the regulatory characteristics of the enteric nervous system carried out in close connection with neurotransmitters, which gave the doctoral student reason to formulate the goal and objectives of the present dissertation work.

The aim of the present study is to study the histological structure of the digestive tract wall and the expression of the splicing variants of the mRNA of the ChAT enzyme in the digestive tract of C57Bl/6NCrl mice. To achieve the goal, the doctoral student has set herself eight tasks, including determining the nucleotide sequence of the splicing variants of ChAT in the

enteric nervous system, designing a specific set of primers for the splicing variants of the mRNA of the ChAT enzyme and quantitative PCR with the specific primer pairs for each splicing variant.

The study material is sufficient in volume, properly selected and structured, well-documented and precisely registered, which guarantees the reliability of the results.

Research methodology. Experimental male mice of the C57Bl/6NCrl breed between 9 and 11 weeks of age were used. Histological preparations for light microscopic examination were made; primer pairs directed to the splicing variants of the mRNA of the cholineacetyltransferase enzyme were made; PCR amplification of the studied splicing variants and synthesis of complementary DNA were performed. Statistical methods were appropriately selected and provided the necessary informativeness for the study. Statistical analysis of the data was performed using one-way ANOVA, followed by a multiple post-hoc Tukey test.

Results. The results of the study are clearly demonstrated and analyzed in the presented documentation (graphs and tables). The data from the present study present the histological features of the digestive tract wall in C57Bl/6NCrl mice using the Swiss roll technique. The plexus myentericus is clearly visualized with myenteric ganglia varying in size, shape and orientation in different parts of the digestive tract. The submucosal plexus is represented by smaller ganglia scattered among the connective tissue of the layer.

With the genetic analysis conducted, the doctoral student established expression of the splicing variants M, cChAT and pChAT, which suggests the presence of different transcriptional forms of the enzyme in the enteric intestinal tract. The concomitant expression of these three isoforms suggests functional heterogeneity of cholinergic neurons in the digestive tract and probably a different role of each of the forms in the regulation of motor and secretory activity.

Relative quantitative analysis by qPCR was used to present the expression levels of the studied splicing variants in the different parts of the gastrointestinal tract without their absolute quantitative measurement. This allows to assess tissue-specific differences in the expression of the splicing variants of ChAT in the context of the functional features of the individual sections of the digestive tract.

The conclusions accurately summarize the results of the study. The essential role of the cholinergic system in mediating intestinal motility, emotional behavior, and cognitive processes is outlined. A reliable marker for visualization of cholinergic structures is the ChAT enzyme. The study establishes expression of the M, cChAT, and pChAT variants of the enzyme in the enteric nervous system along the course of the murine digestive tract. The presence of multiple splicing variants of the mRNA for ChAT is highlighted, which increases the coding potential of the genome and the functional diversity of the synthesized proteins.

Conclusion. The dissertation work of Dr. Desislava Marinova addresses a problem that is of scientific and practical interest in the field of morphological sciences. Scientific results were obtained, enriching knowledge with new and updated data on the histological characteristics

and expression of the splicing variants of the mRNA of the ChAT enzyme in the digestive tract of mice. The author conducted an original targeted study to assess the expression of the splicing variants M, cChAT, and pChAT, which suggests the presence of different transcriptional forms of the enzyme in the enteric intestinal tract. This is a real scientific contribution. The presentation and layout of the dissertation work and the abstract is very good. A large-scale and difficult-to-perform work has been carried out. This shows that the doctoral student possesses theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty, as well as skills for independent scientific research. The materials and documents submitted under the procedure fully comply with the requirements of the Act on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for the Implementation of this Act, the Regulations for the Acquisition of the ONS "Doctor" at the Medical University of Pleven..

Based on the above, I give a positive assessment of the conducted scientific research in the dissertation work, and I propose to the esteemed scientific jury **to award** Dr. Desislava Marinova Marinova the educational and scientific degree "Doctor" in the field of higher education 7. Health and Sport, professional field 7.1 Medicine, scientific specialty "Anatomy, Histology and Cytology".

Prof. Stefan Sivkov, MD, PhD **На основание чл.59 от ЗЗЛД**

11.11.2025