

РЕЦЕНЗИЯ

от професор д-р Димитър Петков Сиврев, дм - Катедра по анатомия при Медицински факултет на Тракийски университет, гр. Стара Загора, на дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен “доктор” по научна специалност “Анатомия, хистология и цитология” в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт и професионално направление 7.1. Медицина, представен от **д-р Десислава Маринова Маринова** – асистент в катедра “Анатомия, хистология, цитология и биология” при Медицински университет - гр. Плевен на тема:

“ПРОУЧВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА ПОЛУЧЕНИТЕ ЧРЕЗ АЛТЕРНАТИВНИЯ СПЛАЙСИНГ ИРНК ВАРИАНТИ НА ХОЛИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗАТА В ЕНТЕРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА НА МИШКА”

Съгласно заповед № 4059/28.10.2025 на Ректор на МУ – гр. Плевен

Необходимост от изследването

Темата на дисертационния проект е актуална, тъй като връзката черва-микробиом-мозък е важна не само за поддържане на нормалното състояние на червата, но и за имунната функция и невропсихичното благополучие на целия организъм. Ентералните неврони използват различни невромедиатори и невромодулатори като между тях ацетилхолин е най-широко застъпен и играе важна роля за правилното функциониране на нервната система. Той участва в основни мозъчни процеси: контрол на движенията, възбуждението, съня. Процесът на обучението и паметта също са свързани с този невромедиатор.

Ензимът холинацетилтрансфераза участва в биосинтеза на ацетилхолин, която се осъществява в цитоплазмата на холинергичните неврони. Този ензим често се използва за визуализиране на холинергичните структури. Сплайсинг вариантите на иРНК за холинацетилтрансфераза, които се транскрибират от гена за този ензим, са нови маркери, използвани за визуализиране на холинергичните структури.

Настоящото изследване на холинацетилтрансфераза на морфологично, генетично и молекулярно ниво е необходимо, тъй като води до опознаване на физиологичното и патологичното състояние на холинергичните неврони в ентералната нервна система, което е от значение не само за науката, но и за лечебната практика.

Анализ по същество на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Десислава Маринова Маринова е представен (заедно с титулната страница и съдържанието) на 126 стандартни страници. Използвана е класическата схема за оформяне на дисертационен труд за ОНС „доктор“.

В главата **“Литературен обзор”**, която обхваща 27 страници (7-33 стр.) са цитирани 238 автори. Всички са на латиница. Разгледани са, както съвременни публикации, така и по-стари статии, което говори за задълбочено търсене на литературни източници по изследваната тема.

В главата **“Цел, задачи и методични подходи”** (34-49 стр.) са представени две ясно формулирани цели, за постигането на които са формулиран и 8 основни задачи.

“Материал и методи”, не са представени като отделна глава, а са част от Втора глава, разположена на 16 страници (34-49 стр.). Подробно са описани използваният материал и приложените изследователски методи. Използвани са:

светлинна микроскопия;

специализиран софтуер за анализ и дизайн на праймери Primer-BLAST;

PCR реакцията за тестване специфичността на праймерните двойки;

PCR амплификация на изследваните сплайсинг варианти, с апарат qTower3 G Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany);

изготвяне на серийни разреждания на генните фрагменти, използвани като матрици за провеждане на PCR анализ с цел конструиране на стандартни криви;

изолиране на РНК от експериментални животни;

синтез на комплементарна ДНК;

количествен PCR със специфичните праймерни двойки и ДНК от стомах, дванадесетопръстник, празно, хълбочно и дебело черво на мишки;

статистически анализ - извършен е със SigmaPlot 11 (Systat Software, USA).

Всички данни от qPCR експериментите на изследваните сплайсинг варианти са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната от три технически повторения за всеки орган при пет животни.

В главата “**Резултати**”, разположена на 31 страници (50-81 стр.) са представени 25 фигури, основани на 7 таблици и 1 самостоятелна таблица (№ 5). Те отразяват резултатите, постигнати при изследване на експресията на получените чрез алтернативния сплайсинг иРНК варианти на холинацетилтрансферазата в ентералната нервна система на мишка.

Главата “**Обсъждане на резултатите**”, е разположена на 16 страници (82-97 стр.). По отношение на особеностите в хистологичното устройство на стената на храносмилателния тракт на мишки порода C57Bl/6NCrl е установено, че тя има общия структурен план, характерен за тръбестите органи. Установява се, че в стената на дванадесетопръстника са налични субмукозни Брунерови жлези само в първите 2 mm от дължината на червото. Това подкрепя публикувани резултати на Williams и Duckworth от 2016 година. .

С използване на методиката Swiss roll, въведена от Reilly и Kirsner през 1981 година, се установява, че ободното черво започва като проксимален колон, следван от средна част и дистален колон, завършващ с характерния за мишките къс ректум и анус. Същинският стомах се характеризира с жлезист епител с цялото разнообразие от клетки, изграждащи кардиачните, фундусните и пилорните жлези.

В изработените от докторанта хистологични препарати ясно е представен *plexus myentericus* (Auerbach), локализиран между вътрешния кръгов и външния надлъжен слой на мускулната обвивка. Това подкрепя резултатите на Kirov и колектив от 2016 година. Добре се очертава и *plexus submucosus*, разположен между лигавицата и мускулната обвивка. В това сплетение се наблюдават малки по размер ганглии, пръснати между съединителнотъканните влакна на субмукозата.

По отношение на функционална организация на ентералната нервна система се подчертава, че ентералните сплетения образуват комплексен нервен апарат, който функционира относително независимо от централната нервна система. Много автори свързват функционалните нарушения в гастроинтестиналния тракт освен с ахалазия, гастропареза, чревна обструкция, болест на Крон и болест на Хиршпрунг, още с развитието на болест на Алцхаймер.

Ацетилхолин е основният възбуждащ медиатор в ентералната нервна система. Той участва в контрола и регулацията на множество физиологични

процеси в гастро-ентералната нервна система. Основният ензим в биосинтезата му е холинацетилтрансфераза. Изследването на различните сплайсинг варианти на иРНК, кодираща синтеза на ензима и тяхната експресия е от значение за разкриването на молекулярните механизми, свързани с тези заболявания.

Генетичният анализ на холинацетилтрансфераза показва, че този ензим се кодира от един ген, който при мишки включва седемнадесет екзона. Въпреки, че мишият ген за холинацетилтрансфераза и неговите регулаторни елементи са обект на интензивни научни изследвания, познанията относно различните модели на експресия на алтернативните сплайсинг варианти на иРНК за холинацетилтрансфераза остават непълни и недостатъчно проучени.

Най-често използваният метод за относителна количествена оценка е $\Delta\Delta C_t$ методът, при който се изчислява промените в експресията между различни експериментални условия или тъкани чрез сравнителен анализ на цикличните прагови стойности (C_t) на таргетния и референтния ген. При този метод се нормализират C_t стойностите на таргетния ген спрямо референтния ген и се сравняват ΔC_t стойностите със съответна контролна проба. Относителното количество на експресия се изчислява чрез формулата $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

В главата **“Заключение”** (98 стр.) се посочва значението на ацетилхолина и холинергичната система в множество физиологични процеси в човешкия организъм. Отбелязва се, че патологични състояния, които се дължат на холингергичен излишък или недостиг, в чиято патогенеза важна роля играе ентералната нервна система, стават достъпни за фармакологична и генна терапия.

В главата **“Изводи”** (99 стр.) на първо място се подчертава значението на метода Swiss roll като оптимален подход за хистологично проучване на гастроинтестиналния тракт при мишка. Във втория извод се посочва, че създадените de novo праймерни двойки за откриване на сплайсинг вариантите M, sChAT и pChAT успешно амплифицират специфични PCR продукти с очакваната дължина. Извършеният относителен количествен анализ на експресията на тези сплайсинг варианти в последователните сегменти на гастроинтестиналния тракт на мишка не показва статистически значими разлики в нивата на експресия.

В глава **“Приноси”** (100 стр.) са представени 3 оригинални и 5 приноса с приложен характер.

Разработена е глава **„Бъдещи насоки и перспективи“** (100 стр.), в която са формулирани бъдещи научни насоки за продължаване на изследователската работа. Осъществяването на тези насоки би допринесло за по-пълното разбиране на посттранскрипционната регулация на холинацетилтрансфераза и ролята на ензима в нормалната и патологична функция на холинергичната сигнализация в ентералната нервна система.

В края на дисертационния труд са поставени две **Приложения** (102-108 стр.), които поясняват използваните методи на изследване.

Главата **„Библиография“** (109-126 стр.) обхваща 270 автори. Представени са както нови публикации, така и по-стари, което позволява да се обхване един голям времеви период и дава по-пълна представа за направените през годините изследвания, и описаните резултати.

Заключение

При изследванията във връзка с дисертационния труд на тема **“ПРОУЧВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА ПОЛУЧЕНИТЕ ЧРЕЗ АЛТЕРНАТИВНИЯ СПЛАЙСИНГ ИРНК ВАРИАНТИ НА ХОЛИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗАТА В ЕНТЕРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА НА МИШКА”** д-р Десислава Маринова Маринова е използвала съвременни обективни научни методи. Резултатите имат не само теоретично, но и важно практическо приложение, свързано със създаване на основа за лечение на заболявания на гастроинтестиналния тракт и нервната система..

Изследването, поставената цел, добре формулираните задачи, обсъждането и изводите доказват, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания, в съответната област, практически умения и способност за самостоятелни научни изследвания.

Изследването представлява оригинален и потвърдителен принос в науката, което се потвърждава от посочените на страница 100 три оригинални и пет приноса с приложен характер и доказва, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания в съответната област, както и способност за самостоятелни научни изследвания.

Считам, че дисертационният труд притежава много ценни качества. Той има не само теоретичен, но и научно-приложен характер, поради което му давам **положителна оценка**, и предлагам на членовете на уважаемото научно жури да присъдят на д-р Десислава Маринова Маринова – асистент в Катедрата по анатомия, хистология, цитология и биология на Медицински университет, Факултет по медицина, в гр. Плевен, научната и образователната степен “доктор” съгласно изискванията на Закона за развитието на академичния състав и Правилника за приложението му.

10.11.2025год
гр. Стара Загора

Изготвил рецензията: **На основание чл.59 от ЗЗЛД**
/проф. д-р Димитър Сиврев, дм/

REVIEW

by Professor Dimitar Petkov Sivrev, MD, PhD – Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora, on a dissertation for the award of the educational and scientific degree PhD in the scientific specialty “Anatomy, Histology, and Cytology” within Higher Education Area 7 “Healthcare and Sport,” Professional Field 7.1 “Medicine,” submitted by Assistant Professor Desislava Marinova Marinova – Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Medical University, Pleven, entitled:

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

determined by order No. 4059/28.10.2025 of the rector of MU – Pleven

Need for the research

The topic of the dissertation is timely, as the gut–microbiome–brain axis is essential not only for maintaining the normal state of the intestines but also for immune function and neuropsychiatric well-being of the organism as a whole. Enteric neurons utilize various neurotransmitters and neuromodulators, among which acetylcholine is the most prevalent and plays a pivotal role in the proper functioning of the nervous system. Acetylcholine participates in fundamental brain processes such as motor control, arousal, and sleep, and it is closely related to learning and memory.

Choline acetyltransferase (ChAT) is the key enzyme for acetylcholine biosynthesis in the cytoplasm of cholinergic neurons and is commonly used to visualize cholinergic structures. mRNA splice variants of ChAT transcribed from the gene are emerging markers for visualizing cholinergic structures.

A comprehensive investigation of choline acetyltransferase at the morphological, genetic, and molecular levels is therefore necessary to improve our understanding of the physiological and pathological states of cholinergic neurons in the enteric nervous system (ENS), which is important not only for science, but also for medical practice.

Substantive analysis of the dissertation

The dissertation by Dr Desislava Marinova Marinova is presented on 126 standard pages (including title page and table of contents) and follows the classical structure for a PhD thesis.

The chapter “**Literature Review**” spans 27 pages (pp. 7–33) and cites 238 authors, all given in Latin script. Both contemporary publications and earlier works are discussed, reflecting a thorough literature search on the topic.

The chapter “**Aims, Objectives, and Methodological Approaches**” (pp. 34–49) presents two clearly formulated aims addressed through eight major tasks.

“*Materials and Methods*” is presented as a sub-chapter within Chapter Two over 16 pages (pp. 34–49). The materials used and research methods applied are described in detail. The methods include:

- light microscopy;
 - specialized software for primer analysis and design (Primer-BLAST);
 - PCR reactions to test primer-pair specificity;
 - PCR amplification of splice variants using a qTower3 G Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany);
 - preparation of serial dilutions of gene fragments used as templates for constructing standard curves;
 - RNA isolation from experimental animals;
 - synthesis of complementary DNA (cDNA);
 - quantitative PCR with specific primer pairs using DNA from the stomach, duodenum, jejunum, ileum, and colon of mice.
- Statistical analysis was performed with SigmaPlot 11 (Systat Software, USA).
- All qPCR data for the splice variants are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) based on three technical replicates for each organ in five animals.

The “**Results**” chapter (31 pages; pp. 50–81) contains 25 figures based on seven tables and one stand-alone table (No. 5). These present the expression of alternatively spliced ChAT mRNA variants in the mouse enteric nervous system across the gastrointestinal tract.

The “**Discussion**” chapter (16 pages; pp. 82–97) evaluates histological features of the gastrointestinal wall in C57Bl/6NCrl mice, which follow the general structural plan characteristic of tubular organs. Submucosal Brunner’s glands are present in the duodenum only within the first ~2 mm of its length, in agreement with results reported by Williams and Duckworth (2016).

Using the *Swiss roll* technique introduced by Reilly and Kirsner (1981), the colon is shown to begin as a proximal colon, followed by a middle and distal colon, ending with the short mouse rectum and anus. The proper stomach exhibits glandular epithelium with the full variety of cells constituting the cardiac, fundic, and pyloric glands.

In the candidate’s histological preparations, the myenteric plexus (Auerbach) located between the inner circular and outer longitudinal muscle layers is clearly visualized, corroborating findings by Kirov et al. (2016). The submucosal (Meissner) plexus situated between the mucosa and the muscularis is also well delineated; its ganglia are small and scattered among the connective-tissue fibers of the submucosa.

Functionally, the ENS forms a complex neural apparatus that operates relatively independently of the central nervous system. Beyond achalasia, gastroparesis, intestinal obstruction, Crohn’s disease, and Hirschsprung disease, many authors associate gastrointestinal dysfunction with Alzheimer’s disease.

Acetylcholine is the principal excitatory mediator in the enteric nervous system, governing numerous physiological processes in the gastrointestinal tract. choline acetyltransferase is the key enzyme in its biosynthesis. Investigating the alternative mRNA splice variants encoding choline acetyltransferase and their expression helps elucidate the molecular mechanisms underlying these disorders.

Genetic analysis indicates that in mice choline acetyltransferase is encoded by a single gene comprising 17 exons. Despite extensive research on the murine choline acetyltransferase gene and its regulatory elements, patterns of expression for alternative ChAT mRNA splice variants remain insufficiently characterized.

For relative quantification, the most commonly applied approach is the $\Delta\Delta C_t$ method, which estimates expression changes across tissues or experimental conditions by comparing cycle threshold (C_t) values of target and reference genes. Target-gene C_t values are normalized to the reference gene and ΔC_t values are compared to a control sample; relative expression is calculated as $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$.

The “**Conclusion**” chapter (p. 98) highlights the importance of acetylcholine and the cholinergic system in multiple physiological processes in the human body. Pathological conditions due to cholinergic excess or deficiency involving the ENS may thus become amenable to pharmacological and gene-based therapy.

The “**Findings**” chapter (p. 99) emphasize, first, the Swiss roll technique as an optimal approach for histological assessment of the mouse gastrointestinal tract. Second, the de novo primer pairs designed for M, cChAT, and pChAT splice variants successfully amplified specific PCR products of the expected length. Relative quantitative analysis of these splice variants across successive segments of the mouse gastrointestinal tract did not reveal statistically significant differences in expression levels.

The “**Contributions**” (p. 100) list three original contributions and five practical contributions.

The section “**Future Directions and Perspectives**” (p. 100) formulates further research avenues whose implementation would deepen our understanding of post-transcriptional regulation of choline acetyltransferase and the role of the enzyme in normal and pathological cholinergic signaling within the enteric nervous system.

Two **appendices** (pp. 102–108) clarify the methods employed.

The “**Bibliography**” (pp. 109–126) includes 270 authors, encompassing both recent and earlier publications, which allows coverage of a broad temporal span and provides a comprehensive view of prior studies and reported findings.

Conclusion

In conducting the research for the dissertation entitled “**Study of the expression of choline acetyltransferase mRNA alternative splicing isoforms in the mouse enteric nervous system**” Dr Desislava Marinova Marinova employed modern, objective scientific methods. The results have not only theoretical but also important practical significance, establishing a foundation for potential treatment of diseases of the gastrointestinal tract and the nervous system.

The research, its stated aim, the well-formulated tasks, the discussion, and the conclusions demonstrate that the candidate possesses in-depth theoretical knowledge in the field, practical skills, and the capacity for independent scientific work.

The study constitutes both original and confirmatory contributions to science—as evidenced by the three original and five applied contributions listed on p. 100 attesting to the candidate’s deep theoretical grounding and ability to conduct independent research.

I am convinced that the dissertation possesses many valuable qualities. It has not only theoretical but also scientific-applied merit. Therefore, I give it a positive evaluation and recommend that the esteemed scientific jury award Assistant Professor Desislava Marinova Marinova - Department of Anatomy, Histology, Cytology, and Biology, Medical University, Faculty of Medicine, Pleven, the educational and scientific degree PhD, in accordance with the Law on the Development of the Academic Staff and its implementing regulations.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

10.11.2025

Stara Zagora

/Prof. Dimitar Sivrev, MD, PhD/