

**ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНО ЖУРИ,
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД № 4059/28.10.2025
НА РЕКТОРА НА МУ – ПЛЕВЕН**

С Т А Н О В И Щ Е

от проф. д-р Николай Димитров Димитров, дм

Ръководител на катедра „Анатомия“ в Медицински факултет на Тракийски университет – Стара Загора, ул. Армейска 11, Стара Загора, 6000, България

Email: nikolay.dimitrov@trakia-uni.bg

Избран за член на научното жури

Относно: Дисертационен труд за присъждане на научна и образователна степен „доктор“, представен от докторанта д-р Десислава Маринова Маринова на тема „Проучване експресията на получените чрез алтернативния сплайсинг иРНК варианти на холинацетилтрансферазата в ентералната нервна система на мишка“ с научен ръководител доц. д-р Стефан Венелинов Трифонов, дм.

Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № 4059/28.10.2025 г. на Ректора на Медицински университет – Плевен (МУ – Плевен) съм определен за член на Научно жури за присъждане на научна и образователна степен „доктор“ в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт в професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“. Автор на дисертационният труд е д-р Десислава Маринова Маринова, редовен докторант в Катедра по „Анатомия, хистология, цитология и биология“, МУ – Плевен. Представените ми документи и материали съответстват на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав на МФ към МУ – Плевен.

Докторантката д-р Десислава Маринова Маринова, е родена на 08.07.1976 г. Завършва висшето си образование във МУ – Плевен с ОКС „Магистър – Лекар“ по медицина през 2000 г. От 2004г. до 2024 работи като лекар към ЦСМП гр. Козлодуй. В периода от 2004 г. до настоящия момент е преподавател към Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, МУ – Плевен. Защищава специалност „Анатомия, хистология и цитология“, през 2008 г. През 2019г. е зачислена за редовен по докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“ към Катедра по „Анатомия, хистология, цитология и биология“, МУ – Плевен. През 2024г. е отчислена от докторантура с право на защита.

Актуалност на тематиката Ентералната нервна система разположена в стената на органите на храносмилателната система контролира разнообразните функции на местно ниво, също така е в комуникация с чревния микробиом. Дисертацията е посветена на изследването на хистологичното устройство на стената на гастроинтестиналния (ГИТ)

на мишки порода C57Bl/6NCrl и експресията на сплайсинг вариантите на ензима холинацетилтрансфераза (ChAT). Съвременни маркери използвани за визуализиране на холинергичните структури са именно сплайсинг вариантите на иРНК за ChAT, които се транскрибират от гена, кодиращ синтеза на ензима. Проучването на тези варианти би допринесло за по-доброто разбиране на физиологичните и патологични състояния на холинергичните неврони в ентэралната нервна система. Темата е актуална и има практическо приложение в сферата на медицинска практика.

Познаване на проблема. Въведението, представя основни сведения за ентэралната нервна система. Най-често използваният невромедиатор от ентэралните неврони е ацетилхолин (ACh). Авторката описва детайлно биосинтезата на ACh като най-често използван маркер за визуализация на холинергичните неврони. Посочена е ролята на сплайсинг вариантите на иРНК, които се транскрибират от гена кодиращ синтеза на ChAT като съвременни маркери за оценка състоянието на невроните. Представените основни сведения във въведението отговарят на съвременните научни проучвания по темата. Творческото използване на цитирания литературен материал показват много добро познаване на състоянието на проблема, разгледан в дисертацията от докторантката.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите. Представеният дисертационен труд е структуриран според общоприетите изисквания – въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане на резултатите и изводи. Представен е на **126 стандартни страници**. Онагледяването на работата включва **5 таблици и 33 фигури** в текста на дисертацията. Цитирани са **270 литературни източника на латиница**.

Литературният обзор прави преглед на структурата и организацията на ентэралната нервна система, основните видове неврони в нейния състав и най-често използваните невромедиатори. Внимателно е описана организацията на гена, кодиращ синтеза на основния невромедиатор, който е използван от ентэралните неврони в лицето на ChAT. Описана е ролята на алтернативния сплайсинг в генната експресия на ниво РНК. Посочват се сплайсинг вариантите на иРНК, които се транскрибират от мишия ген за ChAT.

Целта и задачите в докторския труд са дефинирани адекватно и компетентно.

Материалът на изследването е достатъчен като обем, правилно избран, документиран и регистриран, което гарантира достоверност на резултатите. За реализиране на поставените цели и задачи са използвани експериментални мишки от мъжки пол от порода C57Bl/6NCrl на възраст между 9 и 11 седмица. Всички експерименти са проведени съгласно изискванията на българското законодателство за защита и хуманно отношение към опитните животни и с разрешение на националната ветеринарно-медицинска служба към БАБХ (становище № 299/ 13.03.2024).

Методика на изследването. Докторантката е използвала методи достатъчни и надежни за постигане на поставената цел. Изработени са светлинно-микроскопски препрати по адекватна хистологична методика, позволяваща демонстриране на ентэралните сплетения по хода на ГИТ. Направен е дизайн на праймерни двойки насочени към проучваните сплайсинг варианти на ензима ChAT. Създадени са матрици използвани в PCR реакции за тестване на *de novo* създадените праймери. От изолираната тотална

РНК е извършен синтез на комплементарна ДНК, с която е проведен количествен PCR по утвърден протокол. Статистическите методи са подходящо подбрани и достатъчно информативни.

Резултати и обсъждане. Получените резултати са задълбочено анализирани и нагледно демонстрирани в представената документация. Ясно са представени миентералните и субмукозни ганглийни сплетения в органите на ГИТ. В хода на проведения генетичен анализ докторантката установява експресия на М, сChAT и рChAT във всички проучени органи. В съответствие с данните в литературата резултатите потвърждават доминиращото присъствие на М сплайсинг варианта, описан в структури на ЦНС при гризачи, което подкрепя хипотезата за припокриваемост между централната и ентералната нервна система. Едновременно наличие на сChAT и рChAT сплайсинг вариантите потвърждава ключовата роля на ентералната нервна система като регулаторно и координационно звено на нервната система. Резултатите са подложени на статистически анализ и са представени под формата на достатъчен брой фигури и таблици.

Изводите са два и обобщават вярно резултатите от изследването.

Преценка на публикациите и личните приноси на докторанта. Приносите потвърждават значимостта на представения дисертационен труд. Посочени са три оригинални приноса и три приноса с потвърдителен характер. Основните резултати са публикувани в три публикации в реферирани и индексирани в Scopus и Web of Science списания – една в Journal and Clinical Research и две в Journal of IMAB, в които д-р Маринова е водещ автор. Статията в Journal of IMAB е с IF -0.2 и има три международни цитирания, което демонстрира актуалността на тематиката. Докторантката има и четири съобщения на научни форуми по темата на дисертацията, както и един реализиран университетски проект по темата на дисертационния труд.

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

Препоръките ми са за бъдещо използване на приносите и резултатите от научното изследване и прилагането им в сферата на клиничната практика. Резултатите от настоящото проучване могат да допринесат за разработването на нови диагностични маркери и терапевтични подходи при заболявания, свързани с нарушена холинергична функция.

Заключение. Въз основа на изложеното до тук убедително **давам своята положителна оценка** за проведеното научно изследване в дисертационния труд, като предлагам на уважаемото Научно жури **да присъди** на д-р Десислава Маринова Маринова, докторант редовна форма на обучение, образователната и научна степен „доктор“ в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление. 7.1 Медицина, научна специалност „Анатомия, хистология и цитология“.

Стара Загора, 10.11.2025 г.

Изготвил становището: **На основание чл.59 от ЗЗЛД**

(проф. д-р Николай Димитров, дм)

**TO THE CHAIRMAN OF THE SCIENTIFIC JURY,
DETERMINED BY ORDER No. 4059/28.10.2025
OF THE RECTOR OF MU–PLEVEN**

OPINION

By Prof. Nikolay Dimitrov Dimitrov, MD, PhD

Head of the Department of Anatomy at the Faculty of Medicine, Trakia University –
Stara Zagora, 11 Armeyska St., 6000 Stara Zagora, Bulgaria

Email: nikolay.dimitrov@trakia-uni.bg

Elected as a member of the scientific jury

Subject: Dissertation for awarding the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" presented by the doctoral student Dr. Desislava Marinova Marinova on the topic “Study of the expression of choline acetyltransferase mRNA alternative splicing isoforms in the mouse enteric nervous system” with scientific supervisor Assoc. Prof. Stefan Venelinov Trifonov, MD, PhD.

General presentation of the procedure and the doctoral student. By Order No. 4059/28.10.2025 of the Rector of the Medical University – Pleven (MU–Pleven), I was appointed as a member of the Scientific Jury for the awarding of the educational and scientific degree “Doctor of Philosophy” in Higher Education Area 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, MU–Pleven. The documents and materials submitted to me comply with the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, its Implementing Regulations, and the Rules for the Development of the Academic Staff of the Faculty of Medicine at MU–Pleven.

Dr. Desislava Marinova Marinova was born on 08.07.1976. She graduated from MU–Pleven in 2000 with a master's degree in specialty "Medicine". From 2004 to 2024 she worked as a physician at the Center for Emergency Medical Care, Kozloduy. From 2004 to the present she has been a lecturer at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, MU–Pleven. She obtained the specialty “Anatomy, Histology and Cytology” in 2008. In 2019 she was enrolled as a full-time doctoral student in the doctoral program “Anatomy, Histology and Cytology” at the same department, MU–Pleven. In 2024 she was discharged from doctoral enrollment with the right to defend.

Validity of the topic. The enteric nervous system, located in the wall of gastrointestinal organs, controls diverse functions at the local level and communicates with the gut

microbiome. The dissertation is devoted to the study of the histological structure of the wall of the gastrointestinal tract (GIT) in C57Bl/6NCrl mice and to the expression of splice variants of the enzyme choline acetyltransferase (ChAT). Contemporary markers used to visualize cholinergic structures are precisely the splice variants of the mRNA for ChAT, which are transcribed from the gene encoding the enzyme. Investigating these variants would contribute to a better understanding of the physiological and pathological states of cholinergic neurons in the enteric nervous system. The topic is current and has practical applications in medical practice.

State of the art. The introduction presents essential information about the enteric nervous system. The most frequently used neurotransmitter released by enteric neurons is acetylcholine (ACh). The author describes in detail the biosynthesis of ACh and highlights the role of mRNA splice variants transcribed from the ChAT gene as modern markers for assessing the state of cholinergic neurons. The key information presented in the introduction corresponds to contemporary scientific research. The creative use of the cited literature demonstrates very good knowledge of the state of the problem addressed in the dissertation.

Characterization and evaluation of the dissertation work and contributions. The presented dissertation is structured according to generally accepted requirements—introduction, literature review, aims and tasks, materials and methods, results, discussion, and conclusions—and is presented on 126 standard pages. The visualization of the work includes 5 tables and 33 figures within the text. A total of 270 literature sources in Latin script are cited. The literature review surveys the structure and organization of the enteric nervous system, the major neuronal types within it, and the most commonly used neurotransmitters. The organization of the gene encoding the principal neurotransmitter-synthesizing enzyme used by enteric neurons, namely ChAT, is carefully described. The role of alternative splicing in gene expression at the RNA level is outlined, and the splice variants of the mRNA transcribed from the mouse ChAT gene are presented. The aims and tasks of the doctoral work are defined adequately and competently. The study material is sufficient in volume, correctly selected, documented, and registered, which guarantees the credibility of the results. To achieve the stated aims and tasks, male C57Bl/6NCrl mice aged 9–11 weeks were used. All experiments were conducted in accordance with Bulgarian legislation on the protection and humane treatment of experimental animals and with approval from the National Veterinary-Medical Service at the Bulgarian Food Safety Agency (approval No. 299/13.03.2024).

Methodology of the study. The doctoral student employed methods that are sufficient and reliable for achieving the stated goal. Histological slides were prepared by an appropriate light-microscopic protocol enabling demonstration of the enteric plexuses along the GIT. Primer pairs were designed targeting the investigated splice variants of the ChAT enzyme. Templates were created and used in PCR reactions to test the de novo

designed primers. From isolated total RNA, complementary DNA was synthesized and quantitative PCR was performed according to an established protocol. The statistical methods were appropriately selected and sufficiently informative.

Results and discussion. The results are thoroughly analyzed and clearly presented in the documentation. The myenteric and submucosal ganglionic plexuses in the GIT organs are presented clearly. In the genetic analysis, the doctoral student demonstrates expression of the M, cChAT, and pChAT splice variants in all organs studied. In accordance with the literature, the results confirm the dominant presence of the M splice variant, described in CNS structures in rodents, which supports the hypothesis of overlap between the central and enteric nervous systems. The simultaneous presence of the cChAT and pChAT splice variants confirms the key regulatory and coordinative role of the enteric nervous system. The results were subjected to statistical analysis and are presented in a sufficient number of figures and tables. The conclusions are two in number and correctly summarize the results of the study.

Assessment of the publications and personal contributions of the doctoral student. The contributions confirm the significance of the presented dissertation. Three original contributions and three confirmatory contributions are indicated. The main results are published in three papers in journals indexed in Scopus and Web of Science—one in Journal and Clinical Research and two in the Journal of IMAB—in which Dr. Marinova is the lead author. The article in the Journal of IMAB has an Impact Factor of 0.2 and has received three international citations, demonstrating the topicality of the research. The doctoral student also has four conference presentations on the topic of the dissertation and one completed university project related to the dissertation topic. The dissertation abstract is properly structured and reflects the content, main results, and contributions of the dissertation. My recommendations are directed toward future use of the contributions and results of this research and their application in clinical practice. The present results may contribute to the development of new diagnostic markers and therapeutic approaches in diseases associated with impaired cholinergic function.

Conclusion. Based on the above, I give my unequivocally positive assessment of the scientific research presented in the dissertation and therefore propose to the Honorable Scientific Jury to confer upon Dr. Desislava Marinova Marinova, full-time doctoral student, the educational and scientific degree “Doctor of Philosophy” in Higher Education Area 7. Health and Sport, professional field 7.1 Medicine, scientific specialty “Anatomy, Histology and Cytology.”

November 10, 2025

Member of the Scientific Jury: **На основание чл.59 от ЗЗЛД**
(Prof. Nikolay Dimitrov Dimitrov, MD, PhD)