

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р НИКОЛАЙ ЕЛЕНКОВ ЛАЗАРОВ, д.м.н.
на дисертационен труд на тема *“Хистологично, хистометрично и хистохимично изследване на тънките черва при бронзовата пуйка (Meleagris Meleagris Galloravo)”*
с автор ас. Давид Господинов Йовчев
за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”

Давид Господинов Йовчев е асистент с 12-годишен преподавателски стаж в секция „Цитология, хистология и ембриология” на катедрата по ветеринарна анатомия, хистология и ембриология при Ветеринарномедицински факултет (ВМФ) към Тракийски университет-Стара Загора. През 2019 година той е зачислен за докторант на самостоятелна подготовка (заповед № 2952/30.10.2019 г.) към същата катедра, където е провел експерименталната работа по настоящата дисертация. След приключване на програмата за обучение и успешно положени изпити от индивидуалния учебен план, съгласно решение на Факултетния съвет на ВМФ (протокол №8/10.07.2020 г.) със заповед № 1807/20.07.2020 г. на ректора на университета Йовчев е отчислен с право на защита пред научно жури.

Дисертационният труд на ас. Давид Йовчев е написан на 155 стандартни страници, разпределен по раздели по следния начин: *Съдържание* – 4 стр., *Списък на използваните съкращения* – 1 стр., *Увод* – 2 стр., *Литературен преглед* – 28 стр., *Цел и задачи* – 2 стр., *Материал и методи* – 12 стр., *Резултати* – 58 стр., *Обсъждане* – 22 стр., *Обобщение* – 2 стр., *Изводи* – 2 стр., *Справка за приносите* – 1 стр., *Литература* – 21 стр., включваща 188 заглавия, от които 6 са на кирилица и 182 – на латиница. Трудът е онагледен с 10 таблици с получените данни за макрометрични (тегло, дължина и периметър на тънките черва) и микрометрични показатели (височина, ширина и площ на чревните въси, дълбочина на чревните крипти и техните съотношения; гъстота на чашковидните клетки) в тънките черва при бронзовата пуйка, и 59 фигури, представляващи илюстрации на макроскопския строеж и микроскопската структура на анатомичните им части, както и на находките от проведените хистохимични, вкл. ензимохистохимични реакции за демонстриране на глюкозаминогликани и алкална фосфатаза в лигавицата на тяхната стена.

Темата на дисертационния труд е подбрана удачно. Тя е посветена на актуален проблем от интестиналната морфология с насоченост към биологичното птицевъдство – изясняване на анатомичните, хистологични и хистохимични особености на каудалния отдел на храносмилателната система при бронзовата пуйка, един от най-разпространените

представители на домашните птици. Детайлното познаване на общите и частни закономерности на тънкочревния строеж във възрастов аспект е от решаващо значение за изграждане на превантивна стратегия срущу болести и адекватна развъдно-селективна програма за тези птици. В този смисъл дисертантът си е поставил амбициозната задача с помощта на класически анатомични методи, хистологични и хистохимични техники да обогати наличното познание относно анатомичната характеристика, метричните закономерности и динамиката в морфогенезата и хистогенезата на тънките черва при бронзовата пуйка.

Уводът е кратък, стегнато написан и в синтезиран вид въвежда читателя в предмета на дисертационния труд, насочвайки го към практическото приложение на новопридобитото познание за определяне и поддържане на подходящ хранителен режим и оптимален здравен статус на птиците от тази порода.

Литературният обзор дава обширна информация за известното до момента по темата на проучването. От всички цитирани в библиографията литературни източници, 35 (~19%) статии са от последното десетилетие, включително една от 2019 год, което е още едно доказателство за актуалността на разработвания проблем, пълнотата на библиографската справка и, не на последно място, за добрата литературна осведоменост на дисертанта по него. Обзорът е подразделен тематично на раздели, в първите четири от които авторът ни запознава с макроскопските, микроскопски и морфометрични особености на домашните птици, в частност на пуйките. В следващия раздел със систематична точност и в детайли са приведени литературни данни за хистогенезата и динамиката в развитието на клетките в чревната лигавица с акцент върху чашковидните клетки и техните хистохимични характеристики, и по-конкретно експресията на алкална фосфатаза в чревната мукоза. Прегледът завършва с кратък параграф, в който е обобщено състоянието на проблема, предмет на настоящето проучване, нерешените въпроси по него и е аргументирана необходимостта от тяхното изясняване в предстоящото изследване.

Целта е ясно и точно формулирана. **Задачите** са конкретни, правилно поставени и, както ще се разбере от последващото изложение, са реално изпълними с помощта на приложените методи.

Разделът **Материал и методи** е изчерпателен и добре написан. Общият брой (60) на изследваните бронзови пуйки е напълно достатъчен за получаването на статистически достоверни резултати. Птиците са разпределени във възрастови групи, поравно от двата пола. Експериментите са проведени съгласно нормативната база у нас и при спазване на етичните принципи за работа и хуманно отношение към експериментални животни. За

решаването на поставените задачи са прилагани класически дисекционни техники за изучаване на топографията на тънките черва, рутинно и селективно оцветени хистологични срезове за визуализиране на микроскопския строеж на тяхната стена, морфометрия за определяне на макро- и микроскопските параметри на изучаваните структури и хистохимични техники за демонстриране на химичния състав на екстрацелуларния матрикс и ензимното съдържание на клетъчните елементи. Описанието на експерименталните постановки и използваните методи е дадено стъпка по стъпка в детайли, позволяващи тяхната повтораемост от други изследователи.

Изложението на собствените **резултати** е дадено в отделни подраздели съобразно поставените експериментални задачи. В първия подраздел на нативни макроскопски анатомични препарати е представена външната морфология и топография на тънкочревните сегменти при отделните възрастови групи птици, последвано от описание на макроскопските им параметри (тегло, дължина и периметър), данните от което са обобщени в прегледен табличен вид. Микроскопският строеж на стената на тънките черва е детайлно описан и подходящо илюстриран, като е подчертано, че той следва общия структурен план на тръбестите органи, изградени от трислойна лигавица, подлигавичен слой, мускулатура и сероза. В описанието им се акцентира върху възрастовата динамика в тяхното представителство, върху морфологията на епителните клетки и жлезните елементи в чревните въси и интестинални крипти. Различия при изследваните възрастови групи бронзови пуйки са наблюдавани в метричните параметри на микроструктурните елементи – височина, широчина и площ на чревните въси, дълбочина на криптите и техните съотношения. В следващите раздели са представени хистохимичните резултати в трите части на тънките черва. Те демонстрират морфологията и локализацията на чашковидните клетки в чревните вили и крипти, както и състава на продуцираните от тях глюкозаминогликани с неутрален, кисел или смесен характер, а статистическият анализ разкрива тяхната гъстота и плътност в тънкочревната лигавица на дванадесетопръстника, празното и слабинното черво. Проследена е динамиката в секреторната им активност във възрастов аспект. Ензимохистохимично е доказана експресия на алкална фосфатаза в ентероцитите, покриващи чревните въси и криптите на Либеркюн и са описани промените в интензитета на реакцията през различните възрастови периоди на изследваните птици. Интензитетът на алкалнофосфатазната активност в трите тънкочревни сегмена е оценена полуколичествено и нагледно представена.

Фотодокументацията към дисертационния труд е достатъчно изчерпателна и високоинформативна. Отлично впечатление прави факта, че всички авторски находки са солидно подкрепени от илюстративен материал с много добро качество.

Дискусията е добре написана и показва уменията на дисертанта да интерпретира собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в релевантната литература, и интегрирайки наличните данни да направи ценни изводи за анатомичните особености на тънките черва при бронзовата пуйка. Важно за анатомичната и клиничната практика е приемането на *ansa duodeni* за анатомичен маркер за визуализация на двете части на U-образния дуоденум при тези птици, и на *ligg. ileocecalia* за демаркационна граница между тънко и дебело черво. Интересна е също констатацията, че тънките черва при бронзовата пуйка показват анатомично сходство с тези при бройлерите и се различават в морфологичен и топографски аспект от тези при други пернати като патица, гъска и гълъб. Впечатление прави обсъждането върху метричните закономерности в развитието на тънкочревните сегменти, които корелират с физиологичния растеж на изследваните птици. Получените данни са подложени на сравнителен статистически анализ без обвързване с хранителната диета и половия диморфизъм, а също и с установената селекционна практика. Това дава реално основание на автора да заключи, че достигането на най-високи стойности на чревните периметри през първите четиринадесет дни след излюпването на птиците е нормален биологичен феномен. Освен това, ценен за практиката е и изводът, че нарастването на теглото на тънките черва изпреварва ръста на телесното тегло. Оригинално е и направеното в хода на дискусията предложение за използване на типизирането на чашковидните клетки като надежден маркер за установяване на функционалното състояние, морфологичната интактност и патологичните отклонения в чревната лигавица. В тази връзка изглежда логично да се окаква потенциално приложение на наличните хистометрични данни за диагностика не само на някои неспецифични храносмилателни нарушения, а също и за диагностициране на типичните за бронзовата пуйка ентерити, малдигестия и малабсорбция. Не на последно място специално внимание следва да се отдели на авторското предложение за използване на ензимохистохимичните данни за морфологичен стандарт при проследяване на физиологичния статус на чревната лигавица и определяне на подходяща хранителна диета при отглеждането им. Дисертационният труд завършва с кратко заключение, в което в резюмиран вид са обобщени получените в хода на проучването резултати и научни факти, посочено е и тяхното възможно приложение в развѐдната практика и болестна превенция. Би било добре, според мен, в този раздел да се набележат и насоките за бъдещи изследвания по проблема.

Анализирайки внимателно получените резултати, Йовчев е извел основните изводи от проучването. Те са конкретни и точно и достоверно отразяват авторските находки, тяхната интерпретация и направените заключения, произтичащи от натрупаните от изследването нови данни. Като цяло приемам без забележки тяхната формулировка и научна стойност. Научните постижения на дисертанта са изведени в отделен раздел под формата на кратка справка. Те са разделени на оригинални и потвърдителни приноси, и биха могли да се резюмират както следва:

1. С помощта на анатомични, хистологични и хистохимични методи е проучена прижизнената макро- и микроструктура, и хистохимични особености на тънките черва при бронзовата пуйка във възрастов аспект.
2. Описани са общите морфологични признаци и хистологични закономерности, а също и възрастовите характеристики на клетъчните елементи в тяхната лигавица.
3. Получени са оригинални данни за гъстотата на разпределение, химичния състав и секреторните продукти на чашковидните клетки в епитела на тънките черва.

Няма съмнение, че настоящият дисертационен труд е лично дело на д-р Давид Йовчев. Безспорно доказателство за тази моя констатация, наред с декларацията за достоверност, са представените от него научни публикации и съобщения по темата, като във всички тях той е водещ автор. Резултатите от експериментите са отразени в 3 научни статии в рефериран ветеринарномедицински журнал с импакт ранг (SJR). На рецензента не са известни данни за цитиране на тези публикации в научната литература в страната и/или чужбина. Приложен е и списък с две участия на научни форуми с международно участие у нас и в чужбина.


Дисертацията е написана на разбираем научен език и ясен стил със съответната специфична терминология. Забелязват се само единични правописни и/или стилистични грешки. Авторефератът на дисертационния труд е изготвен съгласно изискванията: той отразява адекватно и в достатъчен обем състоянието на изучавания проблем, поставените цел и експериментални задачи, използваните методи за тяхната практическа реализация, получените резултати, тяхното аналитично описание и интерпретиране на собствените данни, както и направените авторски изводи и приноси.

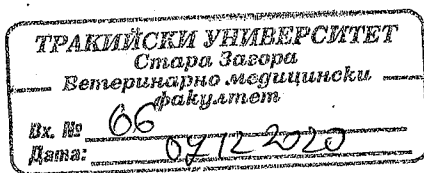
В заключение считам, че настоящият дисертационен труд представлява комплексно и пространно проучване, което обогатява съвременната представа за строежа на храносмилателната система при птиците. То е добре замислено и конкретно обосновано в методично отношение изследване, което е проведено добросъвестно и сполучливо осъществено, резултатите от него са детайлно изложени, подходящо

илюстрирани и адекватно дискутирани. Без съмнение съществен принос за успешната му реализация има и неговият научен ръководител доц. д-р Георги Пенчев. Не констатирах методологични и фактологични недостатъци на разработката. Представеният труд отговаря на критериите за допустимост и минималните национални изисквания за придобиване на ОНС «доктор» съгласно Закона за развитието на академичния състав в Република България и правилника за неговото приложение, и покрива количествените показатели за присъждане на тази степен, посочени в Приложение 8.2 на Правилника за развитието на академичния състав в Тракийски университет-Стара Загора. Всичко това ми дава вътрешната увереност да изразя позитивно мнение за разработения дисертационен труд и да предложа на Научното жури по процедурата да присъди на ас. Давид Господинов Йовчев образователната и научна степен “доктор” по научна специалност “Морфология”, област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“ и професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“.

02.12.2020 г.
гр. София

Рецензент:


(проф. д-р Николай Е. Лазаров, д.м.н)



REVIEW

**by Prof. NIKOLAI ELENKOV LAZAROV, MD, PhD, DSc
of the dissertation work on “*Histological, histometric and histochemical
investigation of the small intestines of the Bronze turkey
(Meleagris Meleagris Gallopavo)*”
with an author Assist. Prof. David Gospodinov Yovchev
for awarding PhD educational and scientific degree**

David Gospodinov Yovchev is an assistant professor with 12 years of teaching experience in the section "Cytology, Histology and Embryology" at the Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology to the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University - Stara Zagora. In 2019 he was enrolled as a PhD student in individual study (Order No. 2952/30 Oct 2019) at the same department where he conducted the experimental work on this dissertation. After the completion of the training program and successfully passed exams from the individual curriculum, according to a decision of the Faculty Council of the Faculty of Veterinary Medicine (protocol No. 8/10 July 2020) by Order No. 1807/20 July 2020 of the University Rector, Yovchev was deregistered with the right of defence at a scientific jury.

The dissertation work of assistant professor David Yovchev is written on 155 standard pages, divided into sections as follows: *Contents* - 4 pages, *List of abbreviations* - 1 page, *Introduction* - 2 pages, *Literature survey* - 28 pages, *Goals and tasks* - 2 pages, *Material and methods* - 12 pages, *Results* - 58 pages, *Discussion* - 22 pages, *Summary* - 2 pages, *Conclusions* - 2 pages, *Reference about contributions* - 1 page, *References* - 21 pages, including 188 titles, of which 6 are in the Cyrillic and 182 - in the Latin alphabet. The work is illustrated with 10 tables with the obtained data for macrometric (weight, length and perimeter of the small intestines) and micrometric indicators (height, width and area of intestinal villi, depth of intestinal crypts and their ratios; density of goblet cells) in the small intestines of the Bronze turkey, and 59 figures representing illustrations of the macroscopic structure and the microscopic structure of their anatomical parts, as well as of the findings from the conducted histochemical, incl. enzyme histochemical reactions to demonstrate glucosaminoglycans and alkaline phosphatase in the mucosa of their wall.

The **topic** of the dissertation paper is adequately chosen. It is dedicated on a current problem of intestinal morphology with a focus on organic poultry breeding - clarification of the anatomical, histological and histochemical features of the caudal section of the digestive system in the Bronze turkey, one of the most common representatives of poultry. The detailed knowledge of the general and special peculiarities of the small intestine structure in terms of age is crucial for

building a preventive strategy against diseases and an adequate breeding and selection program for these poultry. In this sense, the PhD student has set himself the ambitious task with the help of classical anatomical methods, histological and histochemical techniques to enrich the available knowledge concerning the anatomical characteristics, metric patterns and dynamics in the morphogenesis and histogenesis of small intestines in the Bronze turkey.

The **introduction** is short, concisely written and in a synthesized form introduces the reader to the subject matter of the dissertation paper, directing him to the practical application of the newly acquired knowledge to determine and maintain an appropriate diet and optimal health status of poultry from this breed.

The **literature survey** provides extensive information on what is known so far on the topic of the study. Of all the literature sources cited in the references, 35 (~19%) articles are from the last decade, including one from 2019, which is another proof of the relevance of the developed problem, the completeness of the reference review and, last but not least, the good literary awareness of the PhD student on it. The review is sub-divided thematically into sections, in the first four of which the author introduces us to the macroscopic, microscopic and morphometric features of poultry, in particular turkeys. The following section presents, with systematic accuracy and in detail, literature data on histogenesis and dynamics in the development of cells in the intestinal mucosa with a focus on goblet cells and their histochemical characteristics, and in particular the expression of alkaline phosphatase in the intestinal mucosa are presented. The review concludes with a short paragraph, which summarizes the state of the problem, subject of the present study, unresolved issues and the need for their clarification in the forthcoming study is substantiated.

The **goal** is clearly and precisely formulated. The **tasks** are specific, correctly set and, as will be understood from the following presentation, are actually feasible with the help of the methods applied.

The **Material and methods** section is comprehensive and well written. The total number (60) of the studied Bronze turkeys is quite sufficient to obtain statistically reliable results. The birds are divided into age groups, equally for both sexes. The experiments were conducted in accordance with the regulations in our country and in compliance with the ethical principles of work and welfare of the experimental animals. To solve the tasks set, classical dissection techniques were used to study the topography of small intestine, routinely and selectively stained histological sections to visualize the microscopic structure of their wall, morphometry to determine the macro- and microscopic parameters of the studied objects and histochemical techniques to demonstrate the chemical composition of the extracellular matrix and the enzymatic

content of cellular elements. The description of the experimental formulations and the methods used is given step by step in details, allowing their repeatability by other researchers.

The exposition of the own **results** is given in separate subsections according to the experimental tasks set. The first subsection of native macroscopic anatomical preparations presents the external morphology and topography of small intestinal segments in different age groups of birds, followed by a description of their macroscopic parameters (weight, length and perimeter), the data of which are summarized in a tabular form. The microscopic structure of the intestinal wall is described in detail and adequately illustrated, emphasizing that it follows the general structural plan of tubular organs composed of a trilaminar mucosa, submucosal layer, muscle layer and serous membrane. Their description focuses on the age dynamics in their representation, on the morphology of epithelial cells and glandular elements in the intestinal villi and intestinal crypts. Differences in the studied age groups of Bronze turkeys were observed in the metric parameters of the microstructural elements - height, width and area of the intestinal villi, depth of crypts and their ratios. The following sections present the histochemical results in the three parts of the small intestines. They demonstrate the morphology and localization of goblet cells in intestinal villi and crypts, as well as the composition of glucosaminoglycans produced by them with a neutral, acidic or mixed character, and statistical analysis reveals their density and thickness in the small intestinal mucosa of the duodenum, jejunum and ileum. The dynamics of their secretory activity in age aspect has been studied. Enzyme histochemically, the expression of alkaline phosphatase in the enterocytes covering the intestinal villi and the crypts of Lieberkuhn has been demonstrated and changes in the intensity of reaction during the different age periods of the studied birds have been described. The intensity of alkaline phosphatase activity in the three small intestinal segments was assessed semi-quantitatively and visually presented.

The photo documentation in the thesis is sufficiently comprehensive and highly informative. The fact that all the author's findings are solidly supported by illustrative material of very good quality makes an excellent impression.

The **discussion** is well written and shows the ability of the PhD student to interpret his own results, comparing them with known facts in the relevant literature, and integrating the available data to draw valuable conclusions about the anatomical features of small intestines in the Bronze turkey. Important for anatomical and clinical practice is the acceptance of *ansa duodeni* as an anatomical marker for visualization of both U-shaped duodenum parts in these birds, and the *ligg. ileocecalia* as demarcation line between small and large intestine. It is also interesting to note that small intestines of the Bronze turkey show anatomical similarity to those

of broilers and differ morphologically and topographically from those of other birds such as duck, goose and pigeon. The discussion on the metric peculiarities in the development of small intestinal segments, which correlate with the physiological growth of the studied birds, is impressive. The data obtained have been subjected to comparative statistical analysis with no association with the diet and sexual dimorphism, as well as with the established selection practice. This gives the author real reason to conclude that reaching the highest values of intestinal perimeters in the first fourteen days after hatching of birds is a normal biological phenomenon. In addition, the conclusion that the increase in the weight of small intestines outruns the increase in body weight is valuable for the practice. The proposal made in the course of the discussion for the use of goblet cells typing as a reliable marker for establishing the functional state, morphological intactness and pathological deviations in the intestinal mucosa is also original. In this regard, it seems logical to expect potential use of the available histometric data to diagnose not only some non-specific digestive disorders, but also to diagnose enteritis, maldigestion and malabsorption typical of the Bronze turkey. Last but not least, special attention should be paid to the author's proposal for use of enzyme histochemical data as a morphological standard in monitoring the physiological status of the intestinal mucosa and determining an appropriate diet in their rearing. The dissertation work ends with a short conclusion, which summarizes the results and scientific facts obtained in the course of study, and indicates their possible application in breeding practice and disease prevention is also outlined. It would be good, in my opinion, to outline in this section the directions for future research on the topic.

Analysing carefully the results obtained, Yovchev drew the main conclusions from the research. They are specific and accurately, and reliably reflect the author's findings, their interpretation and the conclusions drawn from the new data accumulated by the study. In general, I accept without remarks their wording and scientific value. The scientific achievements of the PhD student are presented in a separate section in the form of a brief reference. They are divided into original and affirmative contributions, and could be summarized as follows:

1. With the help of anatomical, histological and histochemical methods the vital macro- and microstructure, and histochemical features of the small intestines of the Bronze turkey in age aspect have been studied.
2. The general morphological attributes and histological regularities have been described, as well as the age characteristics of the cell components in their mucosa.
3. Original data on the distribution density, chemical composition and secretory products of the goblet cells in the small intestine epithelium have been obtained.

There is no doubt that the present thesis is the personal work of Dr. David Yovchev. Undoubted proof of this finding of mine, along with the declaration of authenticity, are the scientific publications and communications presented by him on the subject, in all of which he is a leading author. The results of the experiments are reflected in 3 scientific articles in a referenced veterinary journal with impact rank (SJR). The reviewer is not aware of any data for citing these publications in the scientific literature in the country and/or abroad. Enclosed is also a list of two participations in scientific forums with international participation at home and abroad.

The dissertation is written in understandable scientific language and clear style with the appropriate specific terminology. Only single spelling and/or stylistic errors have been noticed. The author's abstract of the dissertation work is prepared according to the requirements: it adequately and sufficiently reflects the state of the studied problem, the goal and experimental tasks set, the methods used for their practical implementation, the results obtained, their analytical description and interpretation of own data and the author's conclusions and contributions.

In **conclusion**, I believe that the present dissertation work is a complex and extensive study that enriches the modern idea of the structure of the poultry digestive system. It is a well-conceived and accurately methodologically substantiated study, which was conducted in good faith and successfully carried out, the results of which are detailed, properly illustrated and adequately discussed. Undoubtedly, his research supervisor Assoc. Prof. Dr. Georgi Penchev has a significant contribution to its successful implementation. I did not find any methodological and factual shortcomings of the paper. The submitted work complies with the eligibility criteria and the minimum national requirements for acquiring PhD educational and scientific degree in accordance with the Law on development of academic staff in the Republic of Bulgaria and the rules for its application, and meets the quantitative indicators for awarding this degree, specified in Annex 8.2 of the Rules for development of academic staff at Trakia University - Stara Zagora. All this gives me the inner conviction to express a positive opinion about the developed dissertation paper and to propose to the Scientific jury on the procedure to award Assist. Prof. David Gospodinov Yovchev *PhD* educational and scientific degree in the scientific specialty "Morphology", field of higher education 6. "Agrarian sciences and veterinary medicine" and professional area 6.4. "Veterinary Medicine".

02 Dec 2020
City of Sofia

Reviewer: 

(Prof. Nikolai E. Lazarov, MD, DSc)