

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема:

**„Генетичен скрининг за чести моногенни дефекти сред двойки
предрепродуктивно
– проучване на честотата, рисковете за репродукция и възможностите за
генетична профилактика”**

за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”

Докторска програма: “Медицинска генетика”

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1 Медицина

Автор: Славена Енкова Николова

Научни ръководители: проф. д-р Катя Стефанова Ковачева, дм

Рецензент: проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, дм,
Катедра по Медицинска генетика, МФ, МУ-София,

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Рецензията е изготвена съгласно Заповед 1084/31.03.2026 на Ректора на Медицински Университет – Плевен и Протокол I от 02.04.2026 от заседание на Научното жури.

Представеният комплект материали е в съответствие с Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ-Плевен.

Предоставените материали по защитата съответстват напълно на законовите и процедурните изисквания.

При изготвяне на настоящата рецензия са спазвани изискванията на ЗРАСРБ и ППЗРАСРБ в МУ-Плевен.

2. Кратки данни от професионално-творческата биография на кандидата.

Дисертантът Славена Енкова Николова е лекар със завършено висше медицинско образование в Медицински университет – Плевен (2012–2018 г.), придобивайки образователно-квалификационна степен „магистър“ по медицина. Впоследствие тя

специализира в областта на медицинската генетика, като през периода 2019–2023 г. придобива квалификация „лекар специалист по медицинска генетика“.

Професионалният ѝ път е последователно насочен към развитие в сферата на медицинската генетика и персонализираната медицина. От 2019 г. до момента работи в Лаборатория по медицинска генетика към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен, където изпълнява дейности, свързани с провеждане на медико-генетични консултации, назначаване и интерпретация на генетични изследвания, както и изготвяне на експертни становища. Паралелно с това, в периода 2019–2023 г. участва в научноизследователска дейност като млад учен в център, фокусиран върху персонализираната медицина, 3D и телемедицината, както и роботизирана и минимално инвазивна хирургия, където развива лабораторна и аналитична дейност в геномна лаборатория.

От 2019 г. дисертантът е част и от академичния състав на Медицински университет – Плевен, а от 2024 г. заема длъжността асистент, като участва активно в обучението на студенти по медицина, фармация и здравни грижи чрез провеждане на практически упражнения по медицинска генетика.

Кандидатът притежава добра езикова подготовка с отлично владение на английски език, както и солидни компютърни умения, включително работа със специализиран софтуер за генетичен анализ (NextSeq, MiSeq). Това, в съчетание с придобития практически и научен опит, очертава профил на млад специалист с ясно изразена насоченост към развитие в областта на медицинската генетика и съвременните биомедицински технологии.

3. Актуалност и значимост на разработката.

Представеният дисертационен труд е посветен на проблем с много висока медицинска, социална и общественоздравна значимост - генетичният скрининг за носителство на рецесивни моногенни заболявания сред предрепродуктивни двойки.

През последните десетилетия се наблюдава съществена трансформация в структурата на заболяемостта. Благодарение на напредъка в контрола на инфекциозните заболявания, подобрената хигиена и развитието на терапевтичните подходи, относителният дял на наследствените заболявания нараства. Генетично обусловената патология заема все по-значимо място както в детската, така и във възрастната популация.

Особено място заемат редките болести, голяма част от които са с моногенна етиология, тежко протичане, ранна инвалидизация и ограничени терапевтични възможности.

Финансовата тежест за здравните системи и семействата е значителна, а диагностичният процес често е продължителен и затруднен.

В този контекст предконцепционният скрининг за носителство се утвърждава като най-ефективната стратегия за първична профилактика на тежките рецесивни заболявания. Въвеждането на NGS технологии позволява едновременно изследване на голям брой гени, което трансформира класическите таргетни програми в разширени пан-етнически скрининги.

Особена стойност на дисертацията е, че предоставя данни за българската популация — област, в която съществува ограничена научна информация. Това придава не само научна, но и стратегическа значимост на разработката по отношение на бъдещи национални политики за генетична профилактика.

4. Становище по структурата и съдържанието на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран логично и последователно, като включва всички основни раздели, характерни за научно изследване: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси и публикации. Обемът и разпределението на съдържанието съответстват на изискванията за дисертационен труд.

Литературен обзор

Трудът е с голям обем, съдържа значителен брой таблици и фигури, което улеснява възприемането на резултатите. Дисертацията е структурирана в съответствие с утвърдените академични изисквания и включва всички задължителни компоненти:

- Въведение
- Литературен обзор
- Цел и задачи
- Материал и методи
- Резултати и обсъждане
- Изводи
- Приноси
- Публикации
- Приложения и библиография

Литературният обзор е изчерпателен, аналитичен и добре систематизиран. Разгледани са последователно: епидемиологията и социалната тежест на редките болести; генетичната структура на моногенните заболявания; биологичната същност на носителството; носителският товар в популацията; репродуктивният риск; скринингът като

общественоздравен инструмент; историческо развитие на програмите за носителство; таргетен срещу универсален скрининг; разширен скрининг и неговите ограничения

Особено положително впечатление прави критичният анализ на класическите скринингови модели — Тей-Сакс, бета-таласемия, муковисцидоза — като са разгледани не само успехите, но и ограниченията им. Авторът демонстрира много добро познаване на международните насоки (ACOG, ACMG, ESHG и др.), както и на етичните аспекти на генетичния скрининг.

Обзорът демонстрира задълбочено познаване на проблема и аргументира необходимостта от настоящото изследване.

Цел и задачи

Целта е ясно, точно и научно формулирана — да се изследва носителството на патогенни варианти за рецесивни моногенни заболявания сред предрепродуктивни двойки, да се оцени репродуктивният риск и да се разработят подходи за генетична профилактика. Формулировките са прецизни и съответстват на съвременната геномна методология.

Задачите са добре дефинирани и включват:

1. Да се определи честота и среден брой носителства на патогенни варианти в гени, асоцииращи с рецесивни моногенни състояния в изследваната група индивиди от българската популация.
2. Да се установи профилът на засегнатите гени в изследваната кохорта.
3. Да се проучи молекулната характеристика на патогенните варианти, установени в най-често засегнатите гени.
4. Да се анализират потенциално рисковите двойки и да се идентифицират тези от тях с реален репродуктивен риск.
5. Да се анализират случаите с открити патогенни варианти в гени, които имат отношение към личния здравен риск на носителя.
6. Да се разработи комплексен подход за генетично консултиране, въз основа резултатите от разширения скрининг за носителство и находките, обвързани с репродуктивния риск на двойката и личния здравен риск на носителя.

Материали и методи

Разделът „Материали и методи“ е логически структуриран и следва утвърдения модел за молекулярно-генетични популационни проучвания. Използван е широк спектър от съвременни изследователски методи: клинични и анамнестични методи; лабораторни хормонални изследвания; образни методи; цитогенетичен анализ; PCR техники; директно секвениране; молекулярно-генетични анализи; биоинформатичния анализ; генетичното консултиране; статистическата обработка на резултатите. Тази

многостепенна методологична рамка е адекватна на поставените цели, свързани с оценка на носителството, репродуктивния риск и възможностите за генетична профилактика.

В раздел „Материали“ дисертантът представя подробно характеристиката на изследваната популация, която е методологично адекватно подбрана спрямо поставените цели на научното изследване. В проучването са включени общо 300 клинично здрави индивида, обединени в 150 репродуктивни двойки от българската популация. Всички участници са в репродуктивна възраст и се намират в предконцепционен етап, което придава изразена профилактична насоченост на проведения генетичен скрининг. Подборът е осъществен при липса на данни за кръвнородственост между партньорите, както и без лична или фамилна анамнеза за моногенни заболявания, поради което изследваната кохорта може обосновано да се приеме като представителна за нерискова популационна група. Снемането на лична и фамилна анамнеза и пробонабирането на периферна венозна кръв са извършени в кабинет по медико-генетична консултация към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен, в периода януари 2020 г. – май 2024 г. Всички участници са включени доброволно след подписване на информирано съгласие, одобрено от Етичната комисия към Медицински университет – Плевен, което удостоверява спазването на съвременните етични стандарти при провеждане на генетични изследвания. Представената характеристика на материала е достатъчна, ясно структурирана и създава необходимата основа за надежден анализ на носителския товар и репродуктивния риск в изследваната популация.

Резултати и дискусия

Разделът „Резултати и дискусия“ представлява най-съществената научна част на дисертационния труд и в пълна степен отразява оригиналния принос на дисертанта. Представените резултати са структурирани логично и последователно, в пряко съответствие с поставените цели и задачи на изследването. Авторът извършва комплексна количествена оценка на носителския товар в изследваната българска популация, като установява изключително висок дял на носители на патогенни/вероятно патогенни варианти — 95,6% (287/300), при едва 4,3% индивиди без установен клинично значим рецесивен вариант, което потвърждава концепцията за универсален носителски генетичен товар. Детайлно е анализирано разпределението на носителствата, като са идентифицирани общо 1053 патогенни варианта с различна степен на натрупване при отделните индивиди, демонстриращо полигенния характер на рецесивния риск и модела „дълга опашка“. Извършен е задълбочен профилен анализ на най-често засегнатите гени,

подкрепен със статистическо сравнение с референтни популационни честоти, което позволява идентифициране на популационно специфични особености за българската извадка. Установено е, че патогенни и вероятно патогенни варианти се откриват с най-висока честота в гените *ABCA4*, *BTD*, *CYP21A2*, *NPHS2*, *GJB2*, *CFTR* и *MEFV*, които формират основния носителски спектър в проучването. За част от тях е извършено статистическо сравнение с публикувани референтни популационни честоти, като за гени като *ABCA4*, *BTD* и *CYP21A2* е демонстрирана значимо по-висока честота на носителство в изследваната българска популация.

В представения раздел „Резултати и дискусия“ не се установява анализ на носителството, честотата или вариантния спектър на патогенни изменения в гена *SMN1*, асоцииран със спинална мускулна атрофия — едно от най-честите тежки автозомно-рецесивни невромускулни заболявания с утвърдено значение в предрепродуктивния скрининг. Това се обуславя от методологични ограничения на използвания екзомен NGS подход, който има редуцирана диагностична чувствителност при детекция на копийно-бройни вариации и хомоложни региони в локуса *SMN1/SMN2*. В този смисъл включването на таргетна MLPA/qPCR или друг копийно-бройно чувствителен метод би повишило диагностичната пълнота и клиничната приложимост на проведения скрининг.

В дисертационния труд не се представят собствени резултатни данни относно носителството и вариантния спектър на патогенни изменения в гена **HBV**, въпреки добре установеното му значение като таргет в предрепродуктивния carrier screening, особено в популации с повишена честота на β -таласемия, включително българската. Генът е разгледан предимно в литературен и сравнителен аспект, включително като ориентир при дефиниране на праговете за „често“ носителство, но без емпиричен анализ в рамките на изследваната кохорта.

Представеният профилен генен анализ има съществена научна и практическа стойност, тъй като позволява очертаване на популационно-специфични рискове и създава основа за оптимизиране на национални панели за разширен скрининг за носителство. Особена научна стойност има проведеното молекулно профилиране на патогенните варианти, разкриващо алелна хетерогенност и разширяващо съществуващите данни за вариантния спектър. Значим практически принос представлява анализът на потенциално и реално рисковите репродуктивни двойки, както и оценката на находки, свързани с личния здравен риск на носителите, което разширява клиничната приложимост на разширения скрининг отвъд репродуктивната медицина. Дискусионната част се отличава със

задълбочен сравнителен анализ с международни геномни проучвания, коректна интерпретация на резултатите и аргументирано позициониране на получените данни в контекста на съвременните научни познания. В своята цялост разделът демонстрира висока методологична култура, аналитична зрялост и значима научно-приложна стойност, като убедително доказва изпълнението на поставените цели и приноса на дисертационния труд към развитието на предрепродуктивния генетичен скрининг.

Изводи

Разделът „Изводи“ е логично структуриран, концептуално обобщаващ и отразява в синтезиран вид основните научни резултати от проведеното дисертационно изследване. Формулираните изводи кореспондират пряко с поставените цел и задачи, като демонстрират последователност между изследователски дизайн, получени резултати и направени научно-приложни заключения. Авторът убедително обобщава количествените параметри на носителския товар в изследваната българска популация, като посочва среден брой носителства от 3,5 патогенни варианта на индивид, което потвърждава високата степен на скрит рецесивен генетичен риск и съответства на съвременните популационно-геномни наблюдения.

Особена научна стойност има изводът, свързан с разпределението на засегнатите гени по клинична тежест, при който се установява, че приблизително две трети от най-често засегнатите гени попадат в категориите умерено тежки и леки заболявания. Това наблюдение е интерпретирано в контекста на популационната генетика чрез механизма на отрицателния селекционен натиск, ограничаващ разпространението на силно тежките генетични състояния — интерпретация, която демонстрира аналитична зрялост и задълбочено разбиране на еволюционно-генетичните закономерности.

В изводите коректно е отразена и значителната молекулна хетерогенност на установените патогенни варианти, включително наличието както на класически тежки, така и на хипоморфни и контекст-зависими алели, като се подчертава по-високата честота на варианти с по-лек клиничен ефект. Този анализ има съществено значение за клиничната интерпретация на резултатите и за практическото приложение на разширения carrier screening, особено в контекста на генетичното консултиране и оценката на остатъчния риск.

Като силна страна следва да се отчете, че изводите не се ограничават до чисто описателно обобщение, а включват и интерпретационни и приложни аспекти — идентифициране на популационно-специфични особености, значение за

предрепродуктивната профилактика и принос към оптимизирането на национални скринингови стратегии. Налице е ясна връзка между емпиричните резултати и възможностите за тяхното внедряване в клиничната практика, което придава завършеност на научното изследване.

В своята цялост раздел „Изводи“ е научно обоснован, логически последователен и напълно съответства на мащаба и съдържанието на проведеното изследване, като убедително потвърждава постигането на поставените цел и задачи и подчертава значимостта на труда за развитието на предрепродуктивния генетичен скрининг и медицинската генетика в национален контекст.

Приноси

Разделът „Научни приноси“ е структуриран ясно и отразява в синтезиран вид оригиналните научни и научно-приложни резултати, постигнати в рамките на дисертационния труд. Формулираните приноси кореспондират пряко с поставените цел и задачи и демонстрират завършеност на изследователския цикъл — от популационен генетичен анализ до клинична интерпретация и практическа приложимост. На първо място следва да се открие приносът, свързан с определянето на честотата и профила на носителство на патогенни варианти в широка гама гени, асоциирани с рецесивни моногенни състояния, в нерискова българска популация — изследване с висока епидемиологична и национална значимост, предвид ограничените налични данни в тази област. Получените резултати разширяват съществуващите популационно-геномни познания и създават референтна база за бъдещи скринингови програми.

Съществен научен принос представлява идентифицирането и профилирането на най-често засегнатите гени, както и детайлната молекулярна характеристика на установените патогенни варианти, разкриваща значителна алелна и функционална хетерогенност. Този анализ има не само описателна, но и диагностично-оптимизираща стойност, доколкото позволява прецизиране на таргетните панели за carrier screening с оглед популационно-специфичните особености. Към оригиналните приноси следва да се отнесе и количествената оценка на носителския товар, включително определянето на средния брой носителства на индивид, което има фундаментално значение за разбирането на акумулацията на рецесивен риск в общата популация.

Особено висока научно-приложна стойност има приносът, свързан с анализа на потенциално рисковите и реално рисковите репродуктивни двойки, който пряко адресира основната цел на предрепродуктивния скрининг — превенция на тежки

наследствени заболявания. В този контекст следва да се подчертае разработването на комплексен модел за генетично консултиране при резултати от разширен carrier screening, включително при находки, имащи отношение към личния здравен риск на носителите — принос с подчертано клинично и организационно значение.

Като съвкупност представените приноси могат да бъдат дефинирани както като оригинални научни (популационни, молекулно-генетични, епидемиологични), така и като научно-приложни (скринингови, консултативни, профилактични). Те разширяват съществуващите знания, създават предпоставки за внедряване на разширен предрепродуктивен генетичен скрининг в национален мащаб и имат потенциално значение за здравната политика и генетичната профилактика в България.

В заключение, разделът „Научни приноси“ е обоснован, ясно формулиран и адекватно отразява реалната научна новост и практическа значимост на дисертационния труд, като убедително аргументира неговия принос към развитието на медицинската генетика и предиктивната репродуктивна медицина.

Библиография

Общият брой на цитираните литературни източници е 197, което може да се оцени като напълно достатъчно и съответстващо на мащаба и комплексността на дисертационния труд. В структурно отношение библиографията е коректно оформена и съответства на утвърдените академични стандарти за цитиране. Източниците са разнообразни по тип — оригинални научни статии, систематични обзори, метаанализи, консенсусни становища и монографични публикации, което осигурява многоизмерност на литературната база. Положителна оценка заслужава и включването на консенсусни документи, професионални препоръки и гайдлайни на водещи международни организации (напр. ACMG, ACOG, ESHG), което придава нормативна и клинично-приложна тежест на теоретичната рамка и дискуссионната интерпретация.

5. Публикации по темата на дисертацията

Резултатите от изследването са публикувани в 3 научни публикации и участия в научни форуми, което свидетелства за тяхната научна стойност и публичност:

1. Kovacheva KS, Nikolova SE, Kamburova ZB. Carrier screening for single-gene disorders – A brief review. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2021, 14(2):105–116; DOI: 10.2478/jbcr-2021-0015.
2. Nikolova SE, Kamburova ZB, Vasilev PP, Kovacheva KS, Yordanova IA. Autosomal recessive type of dystrophic epidermolysis bullosa with a novel variant in the COL7A1 gene. *Biomedical Reports*, 2024, 21(5):167; DOI: 10.3892/br.2024.1855; PMID: 39301563; PMCID: PMC11411400; Web of Science (ESCI) / Scopus.

3. Kamburova ZB, Dimitrova PD, Dimitrova DS, Kovacheva KS, Popovska SL, Nikolova SE. Lynch-like syndrome with germline WRN mutation in Bulgarian patient with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2023, 21(1):13; DOI: 10.1186/s13053-023-00257-1; PMID: 37452354; PMCID: PMC10349469; Web of Science / Scopus.

Кандидатът представя 3 участия от научни конференции:

1. Nikolova S, Kovacheva K, Kamburova Z. Carrier screening: a pilot study amongst a Bulgarian population. Jubilee Scientific Conference with International Participation “50 Years of Medical Education and Science in Pleven”, 01–03 November 2024.
2. Nikolova S, Kovacheva K, Kamburova Z, Ivanova M, Stankov I. Variant c.895_904del (p.Val301SerfsTer8) in a newborn girl with isolated postaxial polydactyly – a case report. European Human Genetics Conference 2023, Glasgow, Scotland, UK, 10–13 June 2023.
3. Николова С, Ковачева К, Камбурова З, Иванова М, Станков И. Роля на геномните изследвания при пренатално установена бъбречна поликистоза на плода. Трета научна конференция „Генетика в клиничната практика“, хотел Белвил, Дюни, 25–28 май 2023.

Представените научни трудове покриват напълно тематиката на дисертационния труд и съдържат резултати от проведените изследвания.

6. Автореферат

Авторефератът е изготвен съгласно утвърдените академични изисквания за структура и съдържание. Включени са всички задължителни раздели – въведение, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, научни приноси и публикации, представени синтезирано и ясно. Налице е съответствие между автореферата и дисертационния труд по отношение на обхват, методология и научни резултати.

Заклучение

Представеният дисертационен труд е посветен на актуален и научно значим проблем в областта на медицинската генетика — разширения предрепродуктивен скрининг за носителство на моногенни заболявания. Разработката се отличава с ясно формулирана цел, адекватен методологичен подход и използване на съвременни молекулярно-генетични технологии. Получените резултати, свързани с оценката на носителския товар, профилирането на засегнатите гени и анализа на репродуктивния риск, имат оригинален характер и съществена популационна и клинична значимост, особено предвид ограничените данни за българската популация.

Изводите и научните приноси са логично обосновани и произтичат пряко от проведеното изследване, като демонстрират както теоретична, така и научно-приложна стойност. Въпреки отделни методологични ограничения, трудът представлява завършено и стойностно научно изследване.

Считам, че трудът отговаря на изискванията за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. При минимални изисквани 80 точки по групи показатели за ОНС „Доктор“, докторантката има 92.

Всичко това ми дава основание да препоръчвам на уважаваните членове на Научното жури да дадат своя положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ на Славена Енкова Николова.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

14 април 2026 г.

Изготвил рецензия:

гр. София

Проф. д-р Савина Хаджидекова, д.м.

REVIEW

of a dissertation on the topic:

“Preconception carrier screening in couples for common monogenic disorders - study of prevalence, reproductive risk evaluation, and preventive genetic strategies”

for the award of the academic and scientific degree “PhD”

PhD Program: “Medical Genetics”

Field of higher education: 7. Health Care and Sports

Professional field: 7.1 Medicine

Author: Slavena Enkova Nikolova

Supervisors: Prof. Dr. Katya Stefanova Kovacheva, MD

Reviewer: Prof. Savina Petrova Hadzhidekova, MD,
Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Medical
University of Sofia,

1. General presentation of the procedure and the PhD student

This review was prepared in accordance with Order No. 1084 of March 31, 2026, issued by the Rector of the Medical University of Pleven, and Minutes I of April 2, 2026, from a meeting of the Scientific Jury.

The submitted set of materials complies with the Procedure for Awarding the Academic Degree of “PhD” at MU-Pleven.

The materials submitted for the defense fully comply with the legal and procedural requirements.

In preparing this review, the requirements of the Law on Academic Degrees and Academic Titles and the Regulations for its implementation have been observed, as well as the specific Criteria for holding academic positions and acquiring academic degrees at at MU-Pleven were observed.

2. Brief information from the candidate’s professional and creative biography.

The PhD student, Slavena Enkova Nikolova, is a physician who completed her higher medical education at the Medical University of Pleven (2012–2018), earning a Master’s degree in

Medicine. Subsequently, she specialized in the field of medical genetics, obtaining the qualification of “specialist in medical genetics” during the period 2019–2023.

Her professional career has been consistently focused on development in the field of medical genetics and personalized medicine. Since 2019, she has been working at the Medical Genetics Laboratory at the Dr. Georgi Stranski University Hospital in Pleven, where she performs activities related to conducting medical-genetic consultations, ordering and interpreting genetic tests, and preparing expert opinions. Concurrently, from 2019 to 2023, she participated in research activities as a junior researcher at a center focused on personalized medicine, 3D and telemedicine, as well as robotic and minimally invasive surgery, where he conducted laboratory and analytical work in a genomics laboratory.

Since 2019, the PhD student has also been part of the academic staff at the Medical University of Pleven, and since 2024 has held the position of assistant professor, actively participating in the education of students in medicine, pharmacy, and healthcare by conducting practical exercises in medical genetics.

The candidate possesses strong language skills with excellent command of English, as well as solid computer skills, including proficiency in specialized software for genetic analysis (NextSeq, MiSeq). This, combined with the practical and scientific experience gained, outlines the profile of a young specialist with a clear focus on development in the field of medical genetics and modern biomedical technologies.

3. Relevance and significance of the study.

The presented dissertation is dedicated to a problem of very high medical, social, and public health significance—genetic screening for carrier status of recessive monogenic diseases among pre-reproductive couples.

In recent decades, a significant transformation in the structure of morbidity has been observed. Thanks to advances in the control of infectious diseases, improved hygiene, and the development of therapeutic approaches, the relative proportion of hereditary diseases is increasing. Genetically determined pathology is taking on an increasingly significant role in both the pediatric and adult populations.

Rare diseases occupy a special place, a large proportion of which have a monogenic etiology, severe course, early disability, and limited therapeutic options. The financial burden on healthcare systems and families is significant, and the diagnostic process is often lengthy and difficult.

In this context, preconception carrier screening has established itself as the most effective strategy for primary prevention of severe recessive disorders. The introduction of NGS technologies allows for the simultaneous analysis of a large number of genes, transforming classical targeted programs into expanded pan-ethnic screenings.

A particular strength of the dissertation is that it provides data on the Bulgarian population—an area in which scientific information is limited. This lends not only scientific but also strategic significance to the study in terms of future national policies on genetic prevention.

4. Review on the Structure and Content of the Dissertation

The dissertation is structured logically and coherently, including all the main sections characteristic of a scientific study: introduction, literature review, aim and objectives, materials and methods, results, discussion, conclusions, contributions, and publications. The volume and distribution of the content meet the requirements for a dissertation.

Literature Review

The thesis is extensive and contains a significant number of tables and figures, which facilitate the understanding of the results. The dissertation is structured in accordance with established academic requirements and includes all required components:

- Introduction
- Literature Review
- Objective and objectives
- Materials and methods
- Results and Discussion
- Conclusions
- Contributions
- Publications
- Appendices and Bibliography

The literature review is comprehensive, analytical, and well-organized. The following topics are examined in sequence: the epidemiology and social burden of rare diseases; the genetic structure of monogenic diseases; the biological nature of carrier status; the carrier burden in the population; reproductive risk; screening as a public health tool (); the historical development of carrier screening programs; targeted versus universal screening; and expanded screening and its limitations

The critical analysis of classic screening models—Tay-Sachs, beta-thalassemia, cystic fibrosis—is particularly impressive, as it examines not only their successes but also their limitations. The author demonstrates a very good understanding of international guidelines (ACOG, ACMG, ESHG, etc.), as well as the ethical aspects of genetic screening.

The review demonstrates a thorough understanding of the issue and justifies the need for the present study.

Objective and Tasks

The objective is clearly, precisely, and scientifically formulated—to investigate the carrier status of pathogenic variants for recessive monogenic diseases among pre-reproductive couples, to assess reproductive risk, and to develop approaches for genetic prevention. The formulations are precise and consistent with modern genomic methodology.

The tasks are well-defined and include:

1. To determine the frequency and average number of carriers of pathogenic variants in genes associated with recessive monogenic conditions in the studied group of individuals from the Bulgarian population.
2. To establish the profile of the affected genes in the study cohort.
3. To investigate the molecular characteristics of the pathogenic variants identified in the most frequently affected genes.
4. To analyze potentially at-risk couples and identify those with actual reproductive risk.
5. To analyze cases with detected pathogenic variants in genes relevant to the carrier's personal health risk.
6. To develop a comprehensive approach to genetic counseling based on the results of expanded carrier screening and findings related to the couple's reproductive risk and the carrier's personal health risk.

Materials and Methods

The “Materials and Methods” section is logically structured and follows the established model for molecular-genetic population studies. A wide range of modern research methods was used: clinical and anamnestic methods; laboratory hormonal tests; imaging methods; cytogenetic analysis; PCR techniques; direct sequencing; molecular genetic analyses; bioinformatic analysis; genetic counseling; and statistical analysis of results. This multi-level methodological framework is appropriate for the objectives set, which relate to the assessment of carrier status, reproductive risk, and opportunities for genetic prevention.

In the “Materials” section, the author provides a detailed description of the study population, which was selected in a manner methodologically appropriate to the objectives of the research. The study includes a total of 300 clinically healthy individuals, grouped into 150 reproductive couples from the Bulgarian population. All participants are of reproductive age and are in the preconception stage, which gives the genetic screening a distinct preventive focus. Selection was based on the absence of consanguinity between partners, as well as the absence of personal or family history of monogenic diseases; therefore, the studied cohort can reasonably be considered representative of a low-risk population group. The collection of personal and family

medical histories and the collection of peripheral venous blood samples were performed in the medical-genetic counseling office at the University Hospital “Dr. Georgi Stranski” – Pleven, between January 2020 and May 2024. All participants were included voluntarily after signing an informed consent form approved by the Ethics Committee of the Medical University of Pleven, which certifies compliance with current ethical standards in the conduct of genetic research. The presented characterization of the material is sufficient, clearly structured, and provides the necessary basis for a reliable analysis of carrier status and reproductive risk in the studied population.

Results and Discussion

The “Results and Discussion” section constitutes the most substantial scientific part of the dissertation and fully reflects the author’s original contribution. The presented results are structured logically and sequentially, in direct accordance with the stated objectives and tasks of the study. The author performs a comprehensive quantitative assessment of the carrier burden in the studied Bulgarian population, establishing an exceptionally high proportion of carriers of pathogenic/likely pathogenic variants—95.6% (287/300), with only 4.3% of individuals lacking a clinically significant recessive variant, which confirms the concept of a universal carrier genetic burden. The distribution of carrier status was analyzed in detail, with a total of 1,053 pathogenic variants identified, exhibiting varying degrees of accumulation among individuals, demonstrating the polygenic nature of recessive risk and the “long-tail” model. An in-depth profile analysis of the most frequently affected genes was performed, supported by a statistical comparison with reference population frequencies, which allowed for the identification of population-specific characteristics for the Bulgarian sample. It was found that pathogenic and likely pathogenic variants are detected with the highest frequency in the *ABCA4*, *BTD*, *CYP21A2*, *NPHS2*, *GJB2*, *CFTR*, and *MEFV* genes, which form the main carrier spectrum in the study. For some of these, a statistical comparison was performed with published reference population frequencies, and for genes such as *ABCA4*, *BTD*, and *CYP21A2*, a significantly higher carrier frequency was demonstrated in the studied Bulgarian population.

The “Results and Discussion” section presented here does not include an analysis of carrier status, frequency, or the variant spectrum of pathogenic mutations in the *SMN1* gene, associated with spinal muscular atrophy—one of the most common severe autosomal-recessive neuromuscular disorders with established significance in preconception screening. This is due to methodological limitations of the exome NGS approach used, which has reduced diagnostic

sensitivity in detecting copy-number variations and homologous regions in the SMN1/SMN2 locus. In this regard, the inclusion of targeted MLPA/qPCR or another copy-number-sensitive method would enhance the diagnostic completeness and clinical applicability of the screening.

The dissertation does not present original data regarding carrier status and the variant spectrum of pathogenic mutations in the **HBB** gene, despite its well-established importance as a target in pre-reproductive carrier screening, particularly in populations with an increased frequency of β -thalassemia, including the Bulgarian population. The gene is examined primarily from a literature-based and comparative perspective, including as a reference point for defining thresholds for “common” carrier status, but without empirical analysis within the studied cohort.

The presented gene profiling analysis has significant scientific and practical value, as it allows for the identification of population-specific risks and provides a basis for optimizing national panels for expanded carrier screening. Of particular scientific value is the molecular profiling of pathogenic variants, which reveals allelic heterogeneity and expands existing data on the variant spectrum. A significant practical contribution is the analysis of potentially and actually at-risk reproductive couples, as well as the assessment of findings related to carriers’ personal health risk, which extends the clinical applicability of expanded screening beyond reproductive medicine. The discussion section is distinguished by an in-depth comparative analysis with international genomic studies, a correct interpretation of the results, and a well-reasoned positioning of the obtained data within the context of current scientific knowledge. Overall, the section demonstrates a high level of methodological rigor, analytical maturity, and significant scientific and practical value, convincingly proving the achievement of the set objectives and the contribution of the dissertation to the development of pre-reproductive genetic screening.

Conclusions

The “Conclusions” section is logically structured, conceptually summarizing and presenting in a synthesized form the main scientific results of the conducted dissertation research. The formulated conclusions correspond directly to the stated objectives and tasks, demonstrating consistency between the research design, the results obtained, and the scientific and applied conclusions drawn. The author convincingly summarizes the quantitative parameters of the carrier burden in the studied Bulgarian population, indicating an average of 3.5 pathogenic variants per individual, which confirms the high degree of hidden recessive genetic risk and corresponds to current population-genomic observations.

Of particular scientific value is the conclusion regarding the distribution of affected genes by clinical severity, which establishes that approximately two-thirds of the most frequently affected genes fall into the categories of moderately severe and mild diseases. This observation is interpreted in the context of population genetics through the mechanism of negative selection pressure, which limits the spread of very severe genetic conditions—an interpretation that demonstrates analytical maturity and a deep understanding of evolutionary-genetic patterns.

The conclusions also correctly reflect the significant molecular heterogeneity of the identified pathogenic variants, including the presence of both classic severe and hypomorphic and context-dependent alleles, emphasizing the higher frequency of variants with a milder clinical effect. This analysis is of substantial importance for the clinical interpretation of the results and for the practical application of expanded carrier screening, especially in the context of genetic counseling and residual risk assessment.

A key strength is that the conclusions are not limited to a purely descriptive summary but also include interpretive and applied aspects—the identification of population-specific characteristics, implications for pre-reproductive prevention, and contributions to the optimization of national screening strategies. There is a clear link between the empirical results and the possibilities for their implementation in clinical practice, which lends completeness to the scientific study.

Overall, the “Conclusions” section is scientifically sound, logically consistent, and fully corresponds to the scope and content of the study, convincingly confirming the achievement of the set goals and objectives and emphasizing the significance of the work for the development of preconception genetic screening and medical genetics in a national context.

Contributions

The “Scientific Contributions” section is clearly structured and provides a concise overview of the original scientific and applied scientific results achieved within the scope of the dissertation. The contributions outlined correspond directly to the stated objectives and tasks and demonstrate the completeness of the research cycle—from population genetic analysis to clinical interpretation and practical applicability. First and foremost, the contribution related to determining the frequency and carrier profile of pathogenic variants in a wide range of genes associated with recessive monogenic conditions in a non-high-risk Bulgarian population—a study of high epidemiological and national significance, given the limited available data in this

field. The results obtained expand existing population-genomic knowledge and establish a reference baseline for future screening programs.

A significant scientific contribution is the identification and profiling of the most frequently affected genes, as well as the detailed molecular characterization of the identified pathogenic variants, revealing significant allelic and functional heterogeneity. This analysis has not only descriptive but also diagnostic-optimizing value, insofar as it allows for the refinement of target panels for carrier screening with regard to population-specific characteristics. The quantitative assessment of the carrier burden, including the determination of the average number of carriers per individual, should also be considered among the original contributions, as it is of fundamental importance for understanding the accumulated recessive risk in the general population.

Of particularly high scientific and practical value is the contribution related to the analysis of potentially at-risk and actually at-risk reproductive couples, which directly addresses the primary goal of pre-reproductive screening—the prevention of severe hereditary diseases. In this context, the development of a comprehensive model for genetic counseling regarding the results of expanded carrier screening should be highlighted, including findings relevant to the personal health risk of carriers—a contribution of significant clinical and organizational importance.

Taken together, the contributions presented can be defined as both original scientific (population-based, molecular-genetic, epidemiological) and applied scientific (screening, counseling, preventive). They expand existing knowledge, create the conditions for the implementation of expanded preconception genetic screening on a national scale, and have potential significance for health policy and genetic prevention in Bulgaria.

In conclusion, the “Scientific Contributions” section is well-founded, clearly formulated, and adequately reflects the actual scientific novelty and practical significance of the dissertation, convincingly arguing its contribution to the development of medical genetics and predictive reproductive medicine.

Bibliography

The total number of cited sources is 197, which can be considered fully sufficient and commensurate with the scope and complexity of the dissertation. Structurally, the bibliography is correctly formatted and complies with established academic citation standards. The sources are diverse in type—original scientific articles, systematic reviews, meta-analyses, consensus statements, and monographic publications—which ensures the multidimensionality of the

literature base. The inclusion of consensus documents, professional recommendations, and guidelines from leading international organizations (e.g., ACMG, ACOG, ESHG) also deserves positive recognition, as it lends normative and clinically applicable weight to the theoretical framework and the interpretive discussion.

5. Publications on the topic of the dissertation

The results of the study have been published in 3 scientific publications and presented at scientific forums, which attests to their scientific value and public impact:

1. Kovacheva KS, Nikolova SE, Kamburova ZB. Carrier screening for single-gene disorders – A brief review. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2021, 14(2):105–116; DOI: 10.2478/jbcr-2021-0015.
2. Nikolova SE, Kamburova ZB, Vasilev PP, Kovacheva KS, Yordanova IA. Autosomal recessive type of dystrophic epidermolysis bullosa with a novel variant in the COL7A1 gene. *Biomedical Reports*, 2024, 21(5):167; DOI: 10.3892/br.2024.1855; PMID: 39301563; PMCID: PMC11411400; Web of Science (ESCI) / Scopus.
3. Kamburova ZB, Dimitrova PD, Dimitrova DS, Kovacheva KS, Popovska SL, Nikolova SE. Lynch-like syndrome with a germline WRN mutation in a Bulgarian patient with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2023, 21(1):13; DOI: 10.1186/s13053-023-00257-1; PMID: 37452354; PMCID: PMC10349469; Web of Science / Scopus.

The candidate presents 3 presentations from scientific conferences:

1. Nikolova S, Kovacheva K, Kamburova Z. Carrier screening: a pilot study amongst a Bulgarian population. Jubilee Scientific Conference with International Participation “50 Years of Medical Education and Science in Pleven”, November 1–3, 2024.
2. Nikolova S, Kovacheva K, Kamburova Z, Ivanova M, Stankov I. Variant c.895_904del (p.Val301SerfsTer8) in a newborn girl with isolated postaxial polydactyly – a case report. *European Human Genetics Conference 2023*, Glasgow, Scotland, UK, June 10–13, 2023.
3. Nikolova S, Kovacheva K, Kamburova Z, Ivanova M, Stankov I. The role of genomic testing in prenatally diagnosed fetal polycystic kidney disease. *Third Scientific Conference “Genetics in Clinical Practice,”* Belville Hotel, Duni, May 25–28, 2023.

The scientific papers presented fully cover the subject matter of the dissertation and contain the results of the research conducted.

6. Abstract

The abstract has been prepared in accordance with established academic requirements for structure and content. All required sections are included—introduction, purpose and objectives, materials and methods, results, discussion, conclusions, scientific contributions, and publications—and are presented in a concise and clear manner. There is consistency between the abstract and the dissertation in terms of scope, methodology, and scientific results.

Conclusion

The presented dissertation is devoted to a current and scientifically significant problem in the field of medical genetics—extended preconception screening for monogenic disease carrier status. The study is distinguished by a clearly formulated objective, an adequate methodological approach, and the use of modern molecular genetic technologies. The results obtained, related to the assessment of carrier burden, the profiling of affected genes, and the analysis of reproductive risk, are original in nature and have substantial population and clinical significance, especially given the limited data available for the Bulgarian population.

The conclusions and scientific contributions are logically substantiated and derive directly from the conducted research, demonstrating both theoretical and applied scientific value. Despite certain methodological limitations, the work represents a complete and valuable scientific study.

I consider that the work meets the requirements for the award of the educational and scientific degree of “PhD.” With a minimum requirement of 80 points across the indicator groups for the “PhD” degree, the PhD candidate has 92.

All of this gives me reason to recommend to the esteemed members of the Academic Jury that they cast their affirmative vote for the awarding of the educational and scientific degree of “PhD” to Slavena Enkova Nikolova.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

April 14, 2026

Review prepared by:

Sofia

Prof. Savina Hadzhidekova, MD