

## ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ

### РЕЦЕНЗИЯ

от професор. Алексей Славков Савов, д.б,  
СБАЛАГ „Майчин дом” ЕАД. МУ София

**Относно:** Дисертационен труд на д-р Славена Енкова Николова, докторант към Факултет „Медицина” Катедра „Медицинска генетика” на Медицински университет Плевен, за придобиване на ОНС „Доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт  
Професионално направление: 7.1.Медицина, Докторска програма: „Медицинска генетика” на тема „Генетичен скрининг за чести моногенни дефекти сред двойки предрепродуктивно – проучване на честотата, рисковете за репродукция и възможностите за генетична профилактика“.

Със заповед № 1089/ 31.03.2026 на Ректора на Медицински университет Плевен съм избран за член на Научното жури, във връзка с дисертационния труд на д-р д-р Славена Енкова Николова. По процедурата за защитата са представени всички необходими материали съгласно изискванията на Правилник за изискванията, условията и правилата за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет Плевен.

**Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.**

Дисертационният труд е структуриран съгласно приетите изисквания. Той обхваща 180 стандартни страници, от които 152 съдържат основния текст: Въведение – 1 стр.; Литературен обзор – 30 стр.; Цел и задачи – 2 стр.; Материал и методи – 5 стр.; Резултати и обсъждане – 96 стр.; Обобщение – 2 стр.; Изводи – 2 стр.; Приноси – 1 стр. Литературната справка обхваща 197 литературни източника (от тях 2 на кирилица и 195 са на латиница). Дисертацията съдържа 64 таблици, 13 фигури и 5 приложения.

**Цялостното оформяне е старателно и на високо ниво и представя изградения професионалния опит, на докторанта.**

Скринингът за генетично носителство играе ключова роля в първичната превенция на редки наследствени заболявания. Чрез идентифициране дали бъдещите родители носят патогенни варианти, свързани с автозомно-рецесивни или X-свързани заболявания, скринингът позволява на двойките да разберат своите репродуктивни рискове преди тяхна бременност. Тази ранна осведоменост подпомага вземането на информирани решения, позволява навременен достъп до репродуктивни опции, като например преимпланционно генетично изследване или целенасочена пренатална диагностика, и в крайна сметка намалява честотата на тежки моногенни и метаболитни нарушения при новородените. Тъй като, обикновено носителите са асимптоматични и нямат фамилна анамнеза, скринингът за носителство, базиран на популацията, представлява една от най-ефективните стратегии за превенция на предотвратими генетични заболявания и подобряване на дългосрочните резултати за здравето на детето.

**Литературният обзор** разглежда епидемиологията на редките генетични болести и концепцията на скрининговите програми. Докторанта не само представя добре синтезирани актуални данни, а и прави критични бележки засягащи много аспекти по темата на разработката. Прави впечатление, че повечето литературни източници, които докторанта ползва са от последните години, което свидетелства за актуалността на дисертационния труд. Много уместни са забележките относно ограниченията на таргетния скрининг за носителство и съпоставката с универсалния скрининг. Напълно аргументирано фокусът е върху разширения скрининг за носителство и спецификата на неговите елементи. Д-р Николова обръща специално внимание на ограниченията свързани с интерпретацията на генетичните варианти и възможните конфликти от етичен аспект. Прилагането на генетичен скрининг в медицинската практика очертава и значението на медико – генетичната консултация. Като заключение, работната хипотеза е изградена върху идеята за проучване базирано на проспективно проведен скрининг за носителство сред група двойки от българската популация. Факт е, че в България няма общо достъпна информация за честотата на клинично значимите генетични дефекти свързани с „редките болести“ и в този смисъл

проучванията в тази насока могат да бъдат добър ориентир за дизайна на една по- широко насочена скринингова програма.

**Във връзка с поставената цел**, а именно „Да се определи честотата и профилът на носителство на патогенни варианти в гени, асоцииращи с рецесивни моногенни състояния, в група индивиди от българската популация, да се анализират произтичащите от тях репродуктивни рискове и да се разработи подход за генетично консултиране в контекста на резултатите от скрининга за носителство“, д-р Николова **предвижда шест основни задачи, насочени към изграждане на комплексна оценка на** патогенни варианти в гени, асоцииращи с рецесивни моногенни състояния.

**Клиничният материал включва** 150 репродуктивни двойки от българската популация. Правилно са преценени критериите за включване - репродуктивна възраст, предстояща или планирана репродукция, клинично здрави лица, без данни за лична и фамилна анамнеза за моногенни заболявания и без установено кръвно-родство между партньорите. От съществено значение при провеждането на проучвания с такъв дизайн са медико - генетичните консултации преди и след генетичните изследвания. Участниците трябва в детайли да бъдат запознати с ограниченията на скрининговия тест, остатъчният риск при негативни резултати и възможните решения, когато е налице повишен риск за двойката.

**Методологичната част**, използвана в дисертационния труд, представя приложение на съвременни методи за преаналитична обработка на пробите последвана от новогенерационно секвениране и биоинформатичен анализ на данните с утвърдени програми. Д-р Николова обръща внимание на това, че при изготвяне на библиотеките включващи близо 7000 клинично значими гени се анализират само кодиращите последователности и граничните интронни участъци. Използваният метод позволява определяне на еднонуклеотидни варианти, малки инсерции и делеции (indels), но не е информативен по отношение на големи геномни пренареждания. На практика, това силно ограничава идентифицирането на носителски статус при гените свързани със спинална мускулна атрофия, мускулна дистрофия на Дюшен, делеционните алели при муковисцидоза, както и функционални варианти дълбоко разположени в интроните.

**Подобни проблеми могат да наложат използването на допълнителни тестове особено когато това е оправдано от епидемиологична гледна точка.**

Критериите за патогенност на генетичните варианти описани в дисертационния труд са според класификациите на „American College of Medical Genetics and Genomics“ и „Association for Molecular Pathology“.

### **Резултати и обсъждане**

Получените резултати определено са интригуващи и дискутабилни. В достъпната литература няма данни от подобни проучвания за нерискова европейска популация. Високата честота на носителство определено поставя въпроса за значението на генетичния скрининг като подход за определяне на риска и профилактика на редките заболявания. От друга гледна точка, стои въпроса доколко подобно изследване отразява генетичната характеристика на българската популация и би ли могло да послужи за дизайн на една скринингова програма. В това отношение докторанта има реалистична оценка и прави аргументирани заключения. Носителският статус на една популация е динамична система и може да претърпи значителни промени дори в рамките на няколко генерации. **Като пример мога да посоча генетичните характеристики на *CFTR* гена.** Описаните мутации при пациенти през дведесетте години на миналия век не се представят със същите честоти днес. Някои от сравнително честите за този период мутации не са намирани повторно повече от двадесет години. Мутацията с.1001G>A (p.Arg334Gln) отбелязна в дисертационния труд е откривана при пациенти в България като носителски статус, но не и при пациенти с доказана диагноза. Същото касае и с.350G>A (p.Arg117His) R117H, която има много вариабилна пенетрантност и не се свързва напълно с класическия фенотип. Така можем да отбележим, че тълкуването на клиничното значение на много от генетичните варианти е истинско предизвикателство и трябва да следва сигурни доказателства за тяхното функционално значение. Още една мутация, която не присъства сред пациентите изследвани в НГЛ е с.2210C>T (p.Ser737Phe). По данни на Terlizzi et al., 2017 – това е нова *CFTR* мутация, типична за пациенти с произход от региона на Тоскана в Италия. Открита при 9/295 (3%) скринирани пациенти в центъра за муковисцидоза във Флоренция. Много от тях са диагностицирани чрез неонатален скрининг, като някои са се представили с хипохлоремична метаболитна алкалоза. При проследяване повечето са имали: повишени

хлориди в потта, нормална панкреатична функция и нормална белодробна функция. **Може да се направи заключение, че при здрави индивиди много по- често ще бъдат откривани леки варианти на *CFTR*, алели с ниска пенетрантност или *VUS*, отколкото класическите тежки мутации, причиняващи заболяването.** Д-р Николова прави същата оценка, че има статистически значима отрицателна асоциация между честотата на носителство и тежестта на заболяванията, като по-високата честота е свързана с по-лека клинична тежест. Тази тенденция трябва да се взема предвид и при провеждането на масовия неонатален скрининг за муковисцидоза, при който идентифицираните алели и генотипове трябва да бъдат внимателно оценени с оглед прогнозата и терапевтичното поведение.

**По данни на пациенти преминали през Национална генетична лаборатория** разлики по отношение на носителския статус сравнен с този в настоящето проучване има и за *MEFV* гена. Например честота за Европа мутация с.2080A>G p.(Met694Val) е намирана нееднократно при индивиди от софийски регион, но не е отбелязана сред изследваната по дисертационен труд извадка. От друга страна мутациите описани в *SERPINA1* и *DHCR7* гените напълно се припокриват с тези в базата данни на НГЛ. **Изненадваща е липсата на индивиди с намерени мутации в *HBB* гена, което не може да се дължи само на ограниченията на метода,** тъй като при български пациенти с бета таласемия има описани много генетични дефекти в кодиращите участъци на гена.

Друг интересен факт са представените в таблица 7 данни от **сравнението на честотата на носителство** в някои от гените, описани в най много случаи, където е наблюдавано статистическо значимо отклонение спрямо референтните за европейските популации честоти. За съжаление, в страната няма единен и общодостъпен регистър на редките болести, което не дава възможност тези данни да бъдат допълнително потвърдени.

Детайлните анализи на молекулните характеристики на описаните в изследването генетични дефекти разкриват една позната картина на висока алелна хетерогенност, за която автора прави правилна преценка, че - „Екстраполирането към цялата българска популация следва да се прави с повишено внимание и изисква потвърждение в по-големи и представителни извадки“.

### **Медико – генетично консултиране при рисковите двойки**

Този глава на дисертационния труд заслужава специално внимание, защото демонстрира практическото приложение на резултатите от един скринингов тест. Предвид клиничната значимост и различната тежест на генетичните варианти правилното им категоризиране е от съществено значение за това какви препоръки ще бъдат направени за двойката и често са сериозно предизвикателство при взимането на решение. Тук следва да прибавим и случаите, при които е намерен генетичен вариант свързан с условен личен здравен риск. **Като принос от съществено значение посочвам предложения подход за генетично консултиране**

### **Изводи**

Въз основа на получените резултати и подробните анализи докторанта прави десет извода, които приемам без критични забележки. Със същото мнение съм и по отношение на представените приноси.

### **Заключение**

Дисертационния труд на д-р Славена Енкова Николова провокира с интересни казуси и факти, които тя анализира компетентно според съвременните концепции. Прави впечатление, че тя е придобила значителен клиничен и изследователски опит, което и дава предимства за по-нататъшно развитие, като специалист в областта на Медицинската генетика. Компетентната оценка и анализ на собствените резултати и съпоставянето с литературните източници са на високо професионално ниво.

Давам висока положителна оценка на цялостната научна и изследователска продукция на автора и убедено препоръчам на научното жури да присъди научната степен „Доктор” на д-р Славена Енкова Николова

София 04.04.2026 год.

Член на НЖ: **На основание чл.59 от ЗЗЛД**  
(проф. дб Алексей Савов)

## TO THE CHAIRMAN OF THE SCIENTIFIC JURY

### REVIEW EVALUATION

by **Professor. Alexey Slavkov Savov, PhD,**

**SBALAG "Maichin Dom" EAD. MU Sofia**

Regarding: PhD thesis of Dr. Slavena Enkova Nikolova, PhD student at the Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Medical University of Pleven, for the award of the ONS "Doctor" in the field of higher education 7. Health and Sports Professional field: 7.1.Medicine, PhD program: "Medical Genetics" on the topic "**Genetic screening for frequent monogenic defects among couples pre-reproductive - study of the frequency, risks for reproduction and possibilities for genetic prophylaxis**".

By order No. 1089/ 31.03.2026 of the Rector of the Medical University of Pleven, I have been elected as a member of the Scientific Jury in connection with the PhD thesis work of Dr. Slavena Enkova Nikolova. During the defense procedure, all necessary materials were submitted in accordance with the requirements of the Regulations on the requirements, conditions and rules for acquiring scientific degrees and occupying academic positions at the Medical University of Pleven.

**I declare that I have no conflict of interest with the author of the PhD thesis work.**

The PhD thesis work is structured in accordance with the accepted requirements. It covers 180 standard pages, of which 152 contain the main text: Introduction – 1 page; Literature review – 30 pages; Aim and objectives – 2 pages; Material and methods – 5 pages; Results and discussion – 96 pages; Summary – 2 pages; Conclusions – 2 pages; Contributions – 1 page. The bibliography includes 197 literary sources (of which 2 are in Cyrillic and 195 are in Latin). It contains 64 tables, 13 figures and 5 appendices.

The overall design is thorough and of a high level and represents the established professional experience of the PhD student.

Genetic carrier screening plays a key role in the primary prevention of rare hereditary diseases. By identifying whether prospective parents carry pathogenic variants associated with autosomal recessive or X-linked diseases, screening allows couples to understand their reproductive risks before their pregnancy. This early awareness supports informed decision-making, allows timely access to reproductive options, such as preimplantation genetic testing or targeted prenatal diagnosis, and ultimately reduces the incidence of severe monogenic and metabolic disorders in newborns. Since carriers are usually asymptomatic and have no family history, population-based carrier screening represents one of the most effective strategies for the prevention of preventable genetic diseases and improving long-term child health outcomes.

**The literature review** discusses the epidemiology of rare genetic diseases and the concept of screening programs. The PhD student not only presents well-synthesised current data, but also makes critical remarks concerning many aspects of the topic of the thesis. It is striking that most of the literary sources used by the PhD student are from recent years, which testifies to the topicality of the dissertation work. The remarks regarding the limitations of targeted carrier screening and the comparison with universal screening are very relevant. The focus is fully justified on the expanded carrier screening and the specificity of its elements. Dr. Nikolova pays special attention to the limitations related to the interpretation of genetic variants and possible conflicts from an ethical aspect. The application of genetic screening in medical practice also outlines the importance of medical-genetic consultation. In conclusion, the working hypothesis is built on the idea of a study based on prospective carrier screening among a group of couples from the Bulgarian population. The fact is that in Bulgaria there is no generally available information on the frequency of clinically significant genetic defects associated with "rare diseases". In this sense, studies in this direction can be a good guide for the design of a more broadly focused screening program.

In relation to the set goal, namely "To determine the frequency and profile of carriership of pathogenic variants in genes associated with recessive monogenic conditions in a group of individuals from the Bulgarian population, to analyze the resulting reproductive risks and to develop an approach for genetic counseling in the context of the results of carrier screening",

Dr. Nikolova envisages six main tasks aimed at building a comprehensive assessment of pathogenic variants in genes associated with recessive monogenic conditions.

**The clinical material includes** 150 reproductive couples from the Bulgarian population. The inclusion criteria have been correctly assessed - reproductive age, upcoming or planned reproduction, clinically healthy individuals, without data on personal and family history of monogenic diseases and without established consanguinity between the partners. Of essential importance in conducting studies with such a design are medical - genetic consultations before and after genetic testing. Participants should be familiarized in detail with the limitations of the screening test, the residual risk in case of negative results and the possible solutions when there is an increased risk for the couple.

**The methodological part** used in the PhD thesis presents the application of modern methods for pre-analytical processing of samples followed by next-generation sequencing and bioinformatics analysis of the data with validated programs. Dr. Nikolova draws attention to the fact that when preparing the libraries including nearly 7000 clinically significant genes, only the coding sequences and the border intron regions are analyzed. The method used allows the determination of single-nucleotide variants, small insertions and deletions (indels), but is not informative regarding large genomic rearrangements. In practice, this greatly limits the identification of carrier status in genes associated with spinal muscular atrophy, Duchenne muscular dystrophy, deletion alleles in cystic fibrosis, as well as functional variants located deep in the introns. Such problems may necessitate the use of additional tests, especially when this is justified from an epidemiological point of view.

The criteria for pathogenicity of the genetic variants described in the dissertation are according to the classifications of the "American College of Medical Genetics and Genomics" and the "Association for Molecular Pathology".

## **Results and discussion**

The results obtained are both significant and open to discussion. There are no data from similar studies for a non-risk European population in the available literature. The high frequency of carriership definitely raises the question of the importance of genetic screening as an approach

to determining the risk and prevention of rare diseases. From another perspective, the question is to what extent such a study reflects the genetic characteristics of the Bulgarian population and whether it could serve as a design for a screening program. In this regard, the doctoral student has a realistic assessment and makes reasoned conclusions. The carrier status of a population is a dynamic system and can undergo significant changes even within several generations. As an example, I can cite the genetic characteristics of the *CFTR* gene. The mutations described in patients in the 1920s do not present with the same frequencies today. Some of the mutations that were relatively common for this period have not been found again for more than twenty years. The mutation c.1001G>A (p.Arg334Gln) noted in the dissertation has been found in patients in Bulgaria as a carrier status, but not in patients with a proven diagnosis. The same applies to c.350G>A (p.Arg117His) R117H, which has a very variable penetrance and is not fully associated with the classical phenotype. Thus, we can note that the interpretation of the clinical significance of many of the genetic variants is a real challenge and must follow reliable evidence of their functional significance. Another mutation that is not present among the patients studied in the National Genetic Laboratory is c.2210C>T (p.Ser737Phe). According to Terlizzi et al., 2017 – this is a new *CFTR* mutation, typical of patients originating from the Tuscany region in Italy. Found in 9/295 (3%) screened patients at the cystic fibrosis center in Florence. Many of them were diagnosed through neonatal screening, with some presenting with hypochloremic metabolic alkalosis. On follow-up, most had: increased sweat chloride, normal pancreatic function, and normal pulmonary function. It can be concluded that mild *CFTR* variants, low-penetrance alleles, or VUSs, will be detected much more frequently in healthy individuals than the classic severe mutations causing the disease. Dr. Nikolova makes the same assessment that there is a statistically significant negative association between the frequency of carriership and the severity of the diseases, with a higher frequency being associated with a milder clinical severity. This trend should also be taken into account when conducting mass neonatal screening for cystic fibrosis, in which the identified alleles and genotypes should be carefully evaluated with a view to prognosis and therapeutic behavior.

According to data from patients who have undergone testing at the National Genetic Laboratory, there are differences in terms of carrier status compared to that in the present study for the *MEFV* gene. For example, the mutation c.2080A>G p.(Met694Val) common in Europe has been found repeatedly in individuals from the Sofia region, but was not noted among the sample studied in the dissertation. On the other hand, the mutations described in the *SERPINA1* and

*DHCR7* genes completely overlap with those in the NGL database. The lack of individuals with mutations found in the *HBB* gene is surprising, which cannot be due only to the limitations of the method, since many genetic defects in the coding regions of the gene have been described in Bulgarian patients with beta thalassemia.

Another interesting fact is the data presented in Table 7 from the comparison of the carrier frequency in some of the genes described in the most cases, where a statistically significant deviation from the reference frequencies for European populations was observed. Unfortunately, there is no single and publicly available registry of rare diseases in the country, which does not allow these data to be further confirmed.

Detailed analyses of the molecular characteristics of the genetic defects described in the study reveal a familiar picture of high allelic heterogeneity, for which the author correctly assesses that - "Extrapolation to the entire Bulgarian population should be done with caution and requires confirmation in larger and more representative samples."

### **Medical - genetic counseling for couples at risk**

This chapter of the dissertation deserves special attention because it demonstrates the practical application of the results of a screening test. Given the clinical significance and the different severity of genetic variants, their correct categorization is essential for what recommendations will be made for the couple and is often a serious challenge in making a decision. Here we should also add the cases in which a genetic variant associated with a conditional personal health risk was found. As a contribution of essential importance, I point out the proposed approach to genetic counseling

### **Conclusions on the basis of the results**

Based on the results obtained and the detailed analyses, the PhD student draws ten conclusions, which I accept without critical remarks. I am of the same opinion regarding the contributions presented.

## **Conclusion**

The PhD thesis work of Dr. Slavena Enkova Nikolova presents a number of interesting cases and findings, which she competently analyzes according to modern concepts. It is noticeable that she has acquired significant clinical and research experience, which gives her advantages for further development as a specialist in the field of Medical Genetics. The competent assessment and analysis of her own results and the comparison with the literature sources are at a high professional level.

I give a highly positive assessment of the overall scientific and research output of the author and I strongly recommend that the Scientific Jury award the degree of "PhD" to Dr. Slavena Enkova Nikolova

Sofia 04.04.2026

**На основание чл.59 от ЗЗЛД**

Member of the Scientific Committee:

(prof. Alexey Savov PhD)