

# РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. Албена Първанова Тодорова-Георгиева, дбн  
Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет-София

## ОТНОСНО:

Дисертационен труд за присъждане на научната степен “Доктор”  
по научна специалност „Генетика”,  
професионално направление 4.3. „Биологични науки“,  
област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“

на д-р Милена Петрова Стоянова

на тема: „Генетико-диагностично проучване при лица в детска възраст с  
наследствена патология, преминали през кабинета за генетично консултиране“

### Кратки биографични данни

Д-р Милена Петрова Стоянова е родена през 1978 г. в град Ямбол. Завършва медицина през 2002 г. в Медицински Университет – Варна, а през 2009г. е избрана за асистент в учебно научен сектор по медицинска генетика към Катедрата по Педиатрия и Медицинска Генетика, Медицински Университет – Варна (от 2015 година самостоятелна Катедра по Медицинска генетика). През 2010 г. д-р Милена Стоянова придобива специалност Детски Болести, а през 2018 г. специалност Медицинска генетика. Също през 2018 г. д-р Милена Стоянова е зачислена за редовен докторант със заповед № Р-109-430/16.07.2018г. Има публикации в наши и чужди научни списания и участва в 4 научни проекта. Със заповед на Ректора на Медицински Университет – Варна № Р-109-329/ 01.08.2022г. е насрочена дата за публична защита и е определено научното жури за рецензиране на дисертационния труд.

Представеният ми за рецензия труд е правилно структуриран, съгласно възприетите стандарти за присъждане на научната степен „Доктор“. Дисертационният труд обхваща 149 стр., онагледен е с 34 фигури и 17 таблици, използвани са 246литературни източника, от които 25 на кирилица и 221 на латиница.

Въведението представя социалната значимост на наследствените заболявания и вродените аномалии, които макар и редки, често засягат деца и са свързани със сериозни неблагоприятни ефекти както за децата, така и за техните семейства,

здравните системи и обществото. Обръща се внимание на важността на генетичните изследвания и генетичното консултиране при нелечимите случаи, когато пренаталната диагностика е единствена възможност за превенция на генетичните заболявания. Точната генетична диагноза има значение и за подготовка на пациента за нови терапевтични подходи, които вече са факт, макар че все още е малък броят на успешно лечимите генетични заболявания.

**Литературният обзор** започва с преглед, обща характеристика и класификация на Наследствената и вродена патология в детска възраст. Докторантът представя генетичните и негенетични причини, които могат да повлияят растежа, развитието и здравето на детето. Направен е подробен преглед на видовете патологии: хромозомни (включително вариации в броя копия), геномни и моногенни нарушения, митохондриални болести, геномен импринтинг, унипарентна дизомия, видовете мозаицизъм, динамични мутации (включително феноменът на антиципация), мултифакторни състояния. Съществен дял е посветен на епидемиологията на наследствените заболявания в световен мащаб и в България, като са цитирани най-значимите български трудове по темата. Анализирани са и значението на детската заболеваемост и смъртност и разпределение на генетичната патология сред хоспитализирани деца, като са анализирани чуждестранни и български проучвания.

Следващият голям дял е посветен на методите за диагностика при съмнение за генетична патология. Генетичното консултиране и лабораторна диагностика са разгърнати поетапно като включват генеалогичен метод и снемане на данни за фамилната история, физикално изследване и лабораторни изследвания. Цитогенетичните методи, златен стандарт за диагностика на хромозомни аберации, са представени в детайли като е представена поотделно бройката на откритите патологии с и без синдром на Даун. Данните за България са сравнени с други международни проучвания. Следват молекулярно-цитогенетичните методи, FISH и сравнителна геномна хибридизация, PCR, MLPA и секвениране (включително цялостно геномно и екзомно секвениране), като са представени възможностите и недостатъците на всяка една технология. В проценти са представени разкритите патологии с помощта на цялостно екзомно секвениране. Наличните софтуерни и компютърни програми за оценка на дисморфични стигми, както и базите данни са представени в резюме.



Направен е исторически преглед на генетичното консултиране като високоспециализирана дейност в диагностицирането на генетичната патология. Възникването и организацията на генетичното консултиране в България е сравнено с това в чужбина. Разписани са показанията и източниците за насочване към кабинетите за медико-генетично консултиране, както и етапите на самото генетично консултиране и комуникацията със семейството или пациента. Акцентира се върху факта, че медико-генетичните консултанти са дългосрочно ангажирани в проследяването и оказването на подкрепа при всеки конкретен случай.

Разделът „Литературен обзор“ завършва с обобщение на литературните данни, които логично преминават към формулирането на работна хипотеза.

Като цяло представянето на литературния обзор показва, че авторът умело борави с голям брой източници и разностранна информация. Докторантът прецизно анализира и интерпретира предоставената информация като в крайна сметка я поднася в систематизиран вид.

Поставената „Цел“ за оценка и проучване ефекта от дейността на генетичната консултация като подход за клинично – генетичната диагностика при лица със съмнение за наследствена патология в детска възраст за период от десет години е точно и ясно формулирана, като пътят за нейното постигане може да бъде проследен логично в разписаните по-долу задачи.

Задачите са адекватно формулирани за постигане на поставената цел.

Главата „Материали и методи“ представя подробно пациентската група, като са описани подробно показанията за насочване. Таргетната група включва 3124 пациенти, насочени за медико-генетично консултиране и/или генетичен анализ. Представени са различните биологични материали, върху които са изпълнени съответните изследвания.

Диагностичните методи са описани детайлно, като включват клинични методи (документален, генеалогичен метод и снемане на фамилна анамнеза, физикално изследване); лабораторни методи (цитогенетичен анализ; ДНК анализ) и дисморфологични бази данни и софтуерни онлайн-базирани програми. Добро впечатление правят подобрените статистически методи за анализ на данните: непараметрични Chi-square test и Fisher's exact test; регресионен и графичен анализ,

като е използвана Graph Pad Prism 9 софтуерна програма за статистическа обработка на данни.

Като цяло раздел „Материали и Методи“ е правилно структуриран, методиките са представени подробно, което дава възможност да бъдат използвани като ръководство и възпроизведени в други проучвания. Използвана е богата гама от методики, което е едно от достойнствата на предоставения ми за рецензиране труд.

Раздел „Резултати“ е разгърнат в логическа последователност, като резултатите са описани подробно, систематизирани са в таблици и са онагледени с голям брой фигури. Първоначално пациентите са описани по години, пол и възраст и по отношение източници за насочване, като резултатите са онагледени с множество фигури. В последствие пациентите са представени по показания и са класифицирани в 6 групи. Според степен на клиничната вероятност някои от групите са разделени и на подгрупи. Резултатите са визуализирани с подходящи фигури, които показват в коя група попадат най-голям брой пациенти.

В последствие е охарактеризирана подобрена група 968 пациенти, които са подложени на активна диагностична (лабораторна и консултативна) дейност. Проведените цитогенетични изследвания са представени детайлно, описани са установените хромозомни патологии и са визуализирани схематично разпределени по възраст, пол и по групи показания. Установени са около 14% хромозомни патологии. Анеуплоидните състояния представляват 53% от разкритите патологии, структурните нарушения по автозомите са 27%, като някои от тези случаи са доказани фамилни. Чупливост на X хромозомата е установена при 3.5% от изследваните лица. Бройните и структурни нарушения по половите хромозоми са установени при 14.5% от изследваните пациенти. Разпределението по пол в тази категория показва три пъти по-висока честота при момичета, като разликата е статистически значима. Несъответствие между фенотипен и генотипен пол се установява при 1% от изследваните.

В групата на моногенните заболявания чрез ДНК анализ са установени случаи на муковисцидоза (21 деца), болест на Уилсън (6 пациента) и бета-таласемия (6 деца с таласемия майор и 14 с таласемия минор).

При генетичните предразположения чрез ДНК анализ са установени случаи на целиакия, синдром на Gilbert и тромбофилия.



В групата на фармакогенетичните дефекти, са проведени ДНК изследвания за глюкозо-6-фосфат дехидрогеназен дефицит, полиморфизми в гените *TPMT*, *NR3C1* и *NALP1* са изследвани, за да се прецизират терапиите с тиопурины и кортикостероиди.

Подробно са представени и обобщени резултатите от диагностична и консултативна дейност. Някои от пациентите с установени патологии са представени в детайли по отношение на клиничните прояви. Представени са резултатите от приложението на MLPA анализ за диагностични цели при пациенти с малформативни синдроми и нарушения в невропсихическото развитие. Така са установени 5 патологични резултата (9.3% от изследваните пациенти), съответстващи на клиничната симптоматика. Петте случая са описани подробно клинично и по отношение на генетичните находки.

Резултатите от проведения микрочипов анализ и MLPA извън Лаборатория по медицинска генетика, гр. Варна са представени в обобщен вид в дисертационния труд. Патологичните генетични находки са представени в детайли. Интересни данни са представени в таблица 13, където виждаме разпределението на пациентите с проведен ДНК анализ и разкрита патология по групи (нарушение на растежа и/или половото развитие, съмнение за моногенна неметаболитна болест, вероятно наследствено метаболично заболяване, неясен дисморфичен синдром, нарушение в НПР). Направеното сравнение на процента разкрита патология при лица с проведен NGS и друг вид ДНК анализ (секвениране по Sanger, PCR, MLPA на ген/панел от гени и др.) не показва статистически значима разлика. В таблица 14 е представен впечатляващ списък на доказани редки болести/синдроми чрез молекулярно-генетични методи за период от 10 год. Процентно разкритите патологии са обобщени като AP (41,6% от патологията), АД - 33,7%, X – свързани (7,9%) и митохондриални заболявания (2,2%). Нарушения в импринтинга са установени в 7,8% от изследваните (14,6% от разкритата патология).

Резултатите от проведения селективен метаболитен скрининг и ензимен анализ за вродени грешки на метаболизма са представени в таблица по диагнози. В половината от доказаните случаи е установена лизозомна болест на натрупването.

Следват резултатите от активна диагностична консултативна дейност при подбрана група пациенти с генетично неуточнено заболяване, постигнати с помощта на софтуерни онлайн-базирани програми. Този вид програми се оказват незаменим помощник в диагностицирането на деца с малформативни синдроми и заподозряно генетично заболяване. Повече от 200 пациента са обработени по този начин за период

от 4 години и дефинитивната диагноза е сред първите 10 предложения от страна на програмата.

В глава „Обсъждане“ получените данни са анализирани компетентно като от една страна авторът предлага собствен анализ и интерпретация, а от друга ги сравнява с данните от световната литература. Работата завършва със заключение и бъдещи насоки.

На базата на получените резултати и тяхната детайлна интерпретация са формулирани следните изводи:

1. По отношение на дескриптивно-епидемиологичните данни и показания може да се направи извод, че детският контингент съставлява почти половината (46,3%) от всички лица, регистрирани в генетичната структура; повечето са насочени от две от специализираните педиатрични клиники и най-честото клинично показание за насочване е „вероятна хромозомна болест с или без нарушения в половото развитие“.

2. Обобщението и анализът на генетични изследвания за оценка диагностичния лабораторен принос в изясняване етиологията на наследствените нарушения при деца показва, че:

- Конвенционален цитогенетичен анализ е водещо изследване (64,9%), с тенденция към намаляване на фона на навлизащите високо-резолютивни генетични методи за анализ.

- Селективен скрининг (чрез ДНК анализ), за известни моногенни болести, наследствени предразположения и фармакогенетични дефекти: най-голям дял и диагностична разкриваемост се открива при лица със съмнение за муковисцидоза;

- Молекулярно-генетични методи са със следните приложения и характеристики: при пациенти с неясно изоставане в НПП/УмИ с дисморфизъм водещо е приложението на микрочиповия анализ, което налага той да се прилага като метод на първи избор; при пациенти (предимно от мъжки пол) с изоставане в НПП/ASD без дисморфичен фенотип е показан скрининг за FRAXA; при пациенти със съмнение за моногенно заболяване, с акцент върху неврологичната/невромускулна симптоматика от значение е приложението на ДНК секвениране; при пациенти с неясна клинична диагноза приложението на цялоекзомно или клинично екзомно секвениране заема водещо място.



3. Цялостната оценка от десетгодишната дейност на медико-генетичната консултация в мултидисциплинарния диагностичен процес на разкриване генетичната етиология на болести и предразположения при пациенти в детска възраст възлиза на 22,3% с предимство на лабораторно (генетично и метаболитно) доказана причина за заболяването - 17,2% пациенти.

4. Активната генетико-диагностична дейност (лабораторна и консултативна) има основен принос при 34,2% от селектираната група (10,6 % от всички обхванати)

5. Насоките за подобряване подхода за провеждане на клинично - генетична оценка на наследствено заболяване са свързани с извеждане на осъзната необходимост от повишаване активността, доверието и обръщаемостта към генетичните звена преди всичко от доболничната мрежа специалисти по Педиатрия, Психиатрия и Обща медицина и разширяване панела от лабораторни възможности при предполагаеми клинични диагнози

В края на настоящата работа авторът представя своите приноси, разпределени в три тематични групи: (1) научни приноси с оригинален характер с акцент върху проведените за първи път в България (1.1) систематизирана научно-практическа разработка за дескриптивно-епидемиологична характеристика на генетична структура в обслужване на педиатричен контингент пациенти и (1.2) оценка на активната медико-генетична дейност за изграждане на генетичната и/или клинична диагноза на неясно клинично нарушение при пациенти, конкретно в детска възраст; (2) приноси с потвърдителен характер с акценти върху (2.1) водещата роля на лабораторната диагностика при съмнение за генетична болест като ефективен метод за разкриване на хромозомна патология при пренатална диагностична процедура, (2.2) необходимостта от надграждане приложението на конвенционална цитогенетика със съвременни високо-резолютивни молекулярно-генетични методи за диагностика и (2.3) значението на клиничното фенотипиране и селектиране на пациентите като условие за диагностична успеваемост; и (3) приноси с приложен характер с акценти върху (3.1) оптимизиране на методи за молекулярно-генетичен анализ и въвеждането на компютърни програми с дисморфични база данни в диагностичната практика и (3.2) извеждане на насоки за подобряване информираността и подхода за провеждане на клинично - генетична оценка на наследствено заболяване в хода на клиничната консултация.

Посочените приноси категорично показват значимостта на дисертационния труд.

Във връзка с дисертационния труд д-р Милена Стоянова е публикувала 3 статии, от които една на английски и две на български език. Във всички публикации докторантът е първи автор. В допълнение докторантът се представя с 3 участие в научни форуми.

#### В ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Д-р Милена Петрова Стоянова е отличен специалист в областта на педиатричната генетика и медико-генетичното консултиране и се представя като учен с публикации в български и международни списания. Дисертационният труд е плод на задълбочена и прецизна научно-изследователска дейност, подкрепена със съответстващи статистически анализи и красноречиво описание на резултатите и заключенията. Силно впечатление прави критичната интерпретация на резултатите от страна на докторанта, което има важно научно значение.

Предоставената ми за рецензиране дисертация категорично покрива критериите и показателите за придобиване на научната степен "Доктор", определени с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна и отговаря напълно на европейските изисквания за присъждане на въпросната научна степен.

На база на високото качество на дисертацията и отличните ми преки впечатления от работата на Д-р Милена Петрова Стоянова давам положителна оценка на дисертационния труд и убедено препоръчвам на членовете на Научното жури да й присъди научната степен "Доктор".

19.09.2022

  
Проф. Албена Тодорова, дб, дбн