РЕЗЮМЕТА

НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ НА БЪЛГАРСКИ И НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

на

гл. ас. д-р Мария Костадинова Левкова, д.б.

Представени за участие в конкурс за заемане на АД „доцент“ по специалност „Медицинска генетика“, Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки към Факултет Медицина, Катедра „Медицинска генетика“, съгласно обява в Държавен вестник, бр. 83 от 03.10.2023г.

Представените резюмета на научни трудове са общо 23, групирани в две части в съответствие с официалната Академичната справка, както следва:

**I. Научни трудове, покриващи минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“ – 21 бр.**

Показател A1. Дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“ – 1 бр.

Показател В4. Научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of

Science и Scopus) – 5 бр.

Показател Г7. Научни публикации, публикувани в издания, реферирани и

индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of

Science и Scopus) – 15 бр.

**II. Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“ – 2 бр.**

1. **Научни трудове, покриващи минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“ – 21 бр.**

***Показател A1. Дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“.***

1. **Левкова М.,** *„Молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при медико-генетичното консултиране на семейства с инфертилитет“,* Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор", Варна, 2021, 127 стр.
* **Анотация:** Инфертилитетът е универсален, социално значим проблем с огромна клинична и генетична хетерогенност. Проучването е проспективно и е проведено в Лаборатория по медицинска генетика на УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД–Варна. Петдесет участници от женски пол с повтарящи се спонтанни аборти и 50 контролни лица бяха изследвани за 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена, както и за -308 GA варианта в TNF- алфа гена. Петдесет участници от мъжки пол с нарушена сперматогенеза и 20 контролни лица бяха изследвани за наличие на Y микроделеции, delF508, R117H мутациите и 5Т вариант в CFTR гена. Бяха установени двама пациенти с делеции в AZFc региона на Y хромозомата. Беше намерена сигнификантна разлика в разпределението на 5Т варианта в CFTR гена между двете групи и се потвърди потенциалната му роля за нарушена сперматогенеза. Беше открит само един пациент в хетерозиготно състояние с мутация del F508, което не може да се обвърже с клиничната диагноза – oлигозооспермия. Изследваният 14 bp инсерция/делеция вариант в HLA-G гена показа статистически значима разлика в разпределението между двете групи и инсерция вариантът в хомозиготен генотип се асоциира с по-висок риск за прекъсване на бременността. Не беше установена статистически значима зависимост между носителството на – 308 GA полиморфизма в TNF–алфа гена и риска за настъпване на спонтанен аборт в изследваната популация жени.
* **Annotation:** Infertility is a global, socially significant problem with great clinical and genetic heterogeneity. The study was prospective and was conducted in the Laboratory of Medical Genetics in University hospital “St Marina” Varna. Fifty female participants with recurrent miscarriages and 50 control subjects were tested for 14 bp insertion/deletion variant in the HLA-G gene and the -308 GA variant in the TNF- alpha gene. Fifty male participants with impaired spermatogenesis and 20 control subjects were tested for the presence of Y microdeletions, delF508, R117H mutations, and 5Т variant in the CFTR gene. There were two males with a Y microdeletion in the AZFc region. As for the polymorphic variants in the CFTR gene, we found a statistically significant difference in the distribution of 5T variant between the two groups and it could be a reason for impaired spermatogenesis. Only one patient was a heterozygous carrier of the mutation del F508, which could not be linked to his clinical diagnosis oligozoospermia. The results from the present research showed that there was a significant difference in the distribution of the 14 bp insertion/deletion variant in the HLA-G gene among the two tested groups and that the insertion in homozygous state was associated with a higher risk for a miscarriage. No statistically significant correlation was established between carrying the – 308 GA polymorphic variant in the TNF –alpha gene and the risk of a miscarriage in the tested population. Including the present molecular genetic and immunological markers in the routine tests offered to couples with reproductive problems could improve the process of medical genetic counseling, because it would give the opportunity for a more detailed analysis of the causes of recurrent miscarriages and impaired spermatogenesis.

***Показател В4. Пълнотекстови публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация.***

1. Radanova M, Mihaylova G, Nazifova-Tasinova N, **Levkova M**, Tasinov O, Ivanova D, Mihaylova Z, Donev I. *Oncogenic Functions and Clinical Significance of Circular RNAs in Colorectal Cancer*. Cancers. 2021 Jan;13(14):3395. (IF 6.639) Q1
* **Резюме:** Колоректалният рак (КРР) е на второ място по честота на диагностициране при жените и на трето при мъжете в световен мащаб. Ето защо намирането на нови, по-надеждни биомаркери за ранна диагностика, за прогнозиране на метастазите и резистентността към конвенционалните терапии е важно предизвикателство по пътя към лечението на това заболяване. Настоящият обзор представя кръговите РНК (circRNAs) с техните уникални характеристики като потенциални прогностични и диагностични биомаркери при КРР. Обзорът акцентира върху механизма на действие и ролята на circRNA с онкогенни функции в КРР, както и върху връзката между тяхната експресия и клиникопатологичните характеристики на пациентите с КРР. Разбирането на ролята на онкогенните circRNA в патогенезата на КРР нараства бързо и следващата стъпка е използването им като подходящи нови лекарствени цели в персонализираното лечение на пациенти с КРР.
* **Abstract:** Colorectal cancer (CRC) is ranked as the second most commonly diagnosed disease in females and the third in males worldwide. Therefore, the finding of new more reliable biomarkers for early diagnosis, for prediction of metastasis, and resistance to conventional therapies is an important challenge in overcoming the disease. The current review presents circular RNAs (circRNAs) with their unique features as potential prognostic and diagnostic biomarkers in CRC. The review highlights the mechanism of action and the role of circRNAs with oncogenic functions in the CRC as well as the association between their expression and clinicopathological characteristics of CRC patients. The comprehension of the role of oncogenic circRNAs in CRC pathogenesis is growing rapidly and the next step is using them as suitable new drug targets in the personalized treatment of CRC patients.
1. Radanova M., **Levkova M**., Mihaylova G., Manev R., Maneva M., Hadgiev R., Conev N., Donev I. (2022). *Single Nucleotide Polymorphisms in microRNA Genes and Colorectal Cancer Risk and Prognosis*. Biomedicines, 10(1), 156. (IF 6.081) Q1
	* **Резюме:** Нараства интересът към единичните нуклеотидни полиморфизми (SNP) в гените за микроРНК (miRNA), които могат да бъдат свързани с предразположението към колоректален рак (КРР) и следователно с прогнозата на заболяването и/или отговора на лечението. Освен това тези miRNAs-SNPs могат да служат като нови, нискоинвазивни биомаркери за ранно откриване на КРР. В настоящата статия направихме обстоен обзор на различни SNP, които бяха изследвани за връзка с риска от рак на дебелото черво, прогнозата и отговора на лечението. Също така анализирахме резултатите от различни мета-анализи и възможните причини за докладваните противоречиви резултати, особено когато различни изследователски групи са изследвали един и същ SNP в ген за определена miRNA. Това показва, че са необходими повече проучвания от типа случай-контрола, включващи участници с различен етнически произход. Според нашия обзор, три miRNA-SNPs се оказват обещаващи прогностични, диагностични и предсказващи биомаркери за КРР и това са miR-146a rs2910164, miR-27a rs895819 и miR-608 rs4919510.
	* **Abstract:** There is growing interest in single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of microRNAs (miRNAs), which could be associated with susceptibility to colorectal cancer (CRC) and therefore for prognosis of the disease and/or treatment response. Moreover, these miRNAs-SNPs could serve as new, low-invasive biomarkers for early detection of CRC. In the present article, we performed a thorough review of different SNPs, which were investigated for a correlation with the CRC risk, prognosis, and treatment response. We also analyzed the results from different meta-analyses and the possible reasons for reported contradictory findings, especially when different research groups investigated the same SNP in a gene for a particular miRNA. This illustrates the need for more case-control studies involving participants with different ethnic backgrounds. According to our review, three miRNAs-SNPs—miR-146a rs2910164, miR-27a rs895819 and miR-608 rs4919510— appear as promising prognostic, diagnostic and predictive biomarkers for CRC, respectively.
2. **Levkova, M**., Radanova, M., & Angelova, L. *Potential role of dynein‐related genes in the etiology of male infertility: A systematic review and a meta‐analysis*. Andrology. 2022 Nov; 10(8), 1484-1499. (IF 4.456) Q1
	* **Резюме:** Въведение: Свързаните с динеин гени може да имат роля в етиологията на мъжкото безплодие, особено в случаите на нарушена подвижност на сперматозоидите. Цели: Целта на този обзор е да се състави списък на най-важните кандидат-гени, свързани с динеина, които могат да допринесат за безплодието при мъжете. Материали и методи: Беше проведено търсене в бази, като бяха използвани ключовите думи "dynein", "male", "infertility" и бяха приложени строги критерии за включване на статиите. Беше извършен и мета-анализ, като бяха използвани подходящи от намерените проучвания от типа случай-контрола. Отношението на шансовете (OR), резултатът от Z-теста и нивото на значимост бяха определени с помощта на фиксиран модел със стойност на p от 0,05. За проверка на пристрастността на публикациите бяха използвани графики на Фунел. Резултати: На критериите за включване отговаряха 35 проучвания. Бяха открити общо 15 гена, отговорни за производството на динеинови структурни протеини, за производството на динеинови сглобяващи фактори и потенциално свързани с мъжкото безплодие. Общо пет проучвания от типа случай-контрола бяха подходящи за включване в мета-анализа. Вариациите в гените, свързани с динеин, са свързани с повишен риск от мъжко безплодие (OR = 21,52, 95% доверителен интервал 8,34-55,50, Z тест = 6,35, p < 0,05). Процентът на хетерогенност, I2, е 47,00%. Липсата на варианти в динеиновите гени е предимство и това е статистически значимо. Обсъждане: Резултатите от настоящия преглед показват, че патогенни варианти в гените както за синтеза на динеин, така и за факторите за сглобяване на динеин могат да бъдат свързани с мъжко безплодие без наличие на други, подлежащи симптоми. Заключение: Разгледаните в това проучване гени, които участват както в производството, така и в сглобяването на динеина, могат да се използват като молекулярни цели за бъдещи изследвания на етиологията на проблемите с подвижността на сперматозоидите.
	* **Abstract:** Background: The dynein-related genes may have a role in the etiology of male infertility, particularly in cases of impaired sperm motility. Objectives: The goal of this review is to compile a list of the most important dynein-related candidate genes that may contribute to male factor infertility. Materials and methods: Databases were searched using the keywords “dynein,” “male,” “infertility,” and by applying strict inclusion criteria. A meta-analysis was also performed by using the eligible case-control studies. The odd ratios (ORs), the Z-test score, and the level of significance were determined using a fixed model with a p value of 0.05. Funnel plots were used to check for publication bias. Results: There were 35 studies that met the inclusion criteria. There were a total of 15 genes responsible for the production of dynein structural proteins, the production of dynein assembling factors, and potentially associated with male infertility. A total of five case-control studies were eligible for inclusion in the meta-analysis. Variants in the dynein-related genes were linked to an increased the risk of male infertility (OR = 21.52, 95% confidence interval 8.34–55.50, Z test = 6.35, p < 0.05). The percentage of heterogeneity, I2, was 47.00%. The lack of variants in the dynein genes was an advantage, and this was statistically significant. Discussion: The results from the present review illustrate that pathogenic variants in genes both for dynein synthesis and for dynein assembly factors could be associated with isolated cases of male infertility without any other symptoms. Conclusions: The genes addressed in this study, which are involved in both the production and assembly of dynein, could be used as molecular targets for future research into the etiology of sperm motility problems.
3. Tsalta-Mladenov, M.; **Levkova, M**.; Andonova, S. *Factor V Leiden, Factor II, Protein C, Protein S, and Antithrombin and Ischemic Strokes in Young Adults: A Meta-Analysis*. Genes, 2022, 13, 2081. (IF 4.141) Q2
	* **Резюме:** Исхемичните инсулти са една от водещите причини за смъртност в световен мащаб. Целта на този мета-анализ е да се изясни ролята на наследственото предразположение към тромбофилия в етиологията на исхемичните инсулти при млади хора. Ключовите думи „фактор V Leiden (FVL)“, „фактор II“, „протромбин (PT)“, „протеин С (PC)“, „протеин S (PS)“, „антитромбин (AT)“, „исхемичен инсулт“ и „млади“ бяха използвани за търсене в различни бази данни. Избрахме проучвания с участници на възраст между 18 и 65 години. Общо 104 проучвания бяха допуснати за включване в мета-анализа. Според нашите резултати всички изследвани генетични маркери са рискови фактори за исхемичен инсулт (FVL OR = 1,74; PT OR = 1,95; PC OR = 10,20; PS OR = 1,74; AT OR = 3,47; p < 0,05). При повечето от резултатите е налице умерена хетерогенност и са проведени анализи на подгрупите чрез разделяне на проучванията според географското местоположение, съотношението между половете и критериите за подбор на проведеното проучване. Не са установени значителни разлики между групите, но различното географско местоположение е вероятен източник на хетерогенност. Всички изследвани маркери, FVL, протромбин, PC, PS и AT, са значително свързани с повишен риск от исхемичен инсулт при млади хора и ако бъдат изследвани, биха могли да подобрят качеството на грижите за тези пациенти.
	* **Abstract:** Ischemic strokes are one of the leading causes of death worldwide. The aim of this meta-analysis is to elaborate on the role of inherited predisposition to thrombophilia in the etiology of ischemic strokes in young adults. The keywords factor V Leiden (FVL), factor II, prothrombin (PT), protein C (PC), protein S (PS), antithrombin (AT), ischemic stroke, and young were used to search different databases. We selected studies with participants who were between 18 and 65 years. A total of 104 studies were eligible for inclusion in the meta-analysis. All the studied genetic markers were risk factors for ischemic stroke according to our results (FVL OR = 1.74; PT OR = 1.95; PC OR = 10.20; PS OR = 1.74; AT OR = 3.47; p < 0.05). There was moderate heterogeneity for most of the results, and subgroup analyses were conducted by dividing the studies according to the geographic location, gender ratio, and selection criteria of the performed study. There were no significant differences between the groups, but different geographic location was a probable source of heterogeneity. All of the studied markers - FVL, prothrombin, PC, PS, and AT - were significantly associated with increased risk of ischemic stroke in young adults and, if tested, could improve the quality of care.
4. **Levkova, M**., Chervenkov, T., Hachmeriyan, M., & Angelova, L. (2022). *Overview of current NGS testing for male factor infertility*. Russian Open Medical Journal, 11(1), 101. (Scopus, Web of Science) Q4
	* **Резюме:** Цел - Инфертилитетът е глобален здравен проблем. Секвенирането от следващо поколение и таргетните тестове предлагат нови възможности за допълнително диагностициране на причината за мъжкото безплодие. Целта на тази статия е да предостави по-добра представа за наличните понастоящем панели за мъжки стерилитет, дължащ се на нарушена сперматогенеза. Методи - Проведохме проучване в регистъра за генетични изследвания, като използвахме ключовите думи "безплодие", "мъжко безплодие". Събрахме също така информация за броя на тестваните гени, обхвата на панелите, времето за изпълнение и всички допълнителни тестове, които могат да бъдат поръчани. Резултати - В резултат на търсенето бяха открити единадесет лаборатории, предлагащи панелни тестове за мъжко безплодие, като те изследваха 230 различни гена, но 65 гена (28,26%) от различните панели имаха несигурна роля за изследваното състояние. Единственият ген, предложен от всички лаборатории, е *CFTR*. Заключение - Секвенирането от следващо поколение може да бъде изключително полезно в процеса на диагностика на мъжкото безплодие. Въпреки това лекарите трябва да имат предвид, че някои от включените гени имат неясна роля за мъжкото безплодие.
	* **Abstract:** Aim — Infertility is a global health problem. The next-generation sequencing and panel testing are offering new opportunities to further diagnose the reason for male infertility. The aim of this paper is to provide a better insight into the currently available panels for male infertility due to impaired spermatogenesis. Methods — We conducted research in the Genetic testing registry by using the keywords „infertility“, „male infertility“. We also gathered information about the number of tested genes, coverage of the panels, turnaround time, and any additional tests, which could be ordered. Results — As a result there were eleven laboratories, offering panel testing for male infertility, which tested for 230 different genes, but 65 genes (28.26%) from the different panels had an uncertain role for the tested condition. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator was the only gene, suggested by all laboratories. Conclusions — Next-generation sequencing could be extremely helpful in the diagnostic process of male infertility. However, clinicians should be aware that some of the included genes have an uncertain role for male infertility.

***Показател Г7. Публикации и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация.***

1. **Levkova, M**., M. Hachmeriyan, M Stoyanova, V Miteva, L Angelova. *Comparison between thrombophilic gene polymorphisms among high-risk patients*. Romanian Journal of Internal Medicine, DOI:10.2478/rjim-2019-0021, 2019, 1-15. Q3
	* **Резюме:** Въведение: Целта на това проучване е да се сравни ролята на тромбофилните варианти сред две групи високорискови пациенти със съдови нарушения и повтаряща се загуба на бременност. Методи: 200 пациента, включително 76 с тромботични инциденти и 124 с два или повече идиопатични, повтарящи се спонтанни аборта през първия триместър, са изследвани за наличие на полиморфизми на фактор V (F V) Leiden G1691A, фактор II (F II) G20210A, инхибитор на плазминогенния активатор (PAI) 4G/5G и метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) C677T с помощта на полимеразно-верижна реакция в реално време (RT - PCR) в Лабораторията по медицинска генетика, Варна, България между юни 2016 г. и май 2019 г. Честотите на полиморфизмите на тромбофилните гени бяха сравнени между двете групи и с очакваните популационни честоти на генотиповете. Резултати: Лицата с анамнеза за съдови нарушения са имали значително по-висока честота на варианта F V Leiden в сравнение с жените с повтарящи се спонтанни аборти. Няма статистическа разлика между анализираните пациенти по отношение на другите три тромбофилни полиморфизма. Алелните честоти и очакваните генотипни честоти на полиморфизмите F V, F II и MTHFR са изчислени в съответствие с равновесието на Харди-Вайнберг. Процентът на хомозиготите за F V и F II е по-висок от очакваното в двете групи пациенти. При MTHFR няма разлика. Заключение: F V Leiden остава най-силният рисков фактор за съдови нарушения и повтаряща се загуба на бременност. Скринингът за този вариант трябва да се препоръчва на пациенти с тромботични инциденти и на жени с повтарящи се спонтанни аборти. Ролята на F II, PAI и MTHFR остава противоречива.
	* **Abstract:** Introduction: The purpose of this study was to compare the role of the thrombophilic variants among two groups of high-risk patients with vascular disorders and recurrent pregnancy loss. Methods: 200 patients, including 76 with thrombotic accidents and 124 with two or more idiopathic recurrent miscarriage during the first trimester, were tested for the presence of Factor V (F V) Leiden G1691A, Factor II (F II) G20210A, plasminogen activator inhibitor (PAI) 4G/5G, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms using Real time polymerase chain reaction (RT – PCR) in the Laboratory of Medical Genetics, Varna, Bulgaria between June 2016 and May 2019. Frequencies of thrombophilic gene polymorphisms were compared among the two populations and to the expected genotype frequencies. Results: Individuals with a history of vascular disorders had a significantly higher frequency of F V Leiden variant compared to women with recurrent miscarriage. There was no statistical difference between the analyzed patients for the other three thrombophilic polymorphisms. The allelic frequencies and the expected genotype frequencies of the F V, F II and MTHFR polymorphisms were calculated according to Hardy-Weinberg equilibrium. The percentages of the homozygotes for F V and F II were higher than expected in the two groups of patients. For the MTHFR there was no difference. Conclusion: F V Leiden remains the strongest risk factor for vascular disorders and recurrent pregnancy loss. Screening for this variant should be recommended to patients with thrombotic accidents and women with repeated miscarriage. The role of F II, PAI and MTHFR remains controversial.
2. Митева В, М.Хачмериян,М.Стоянова, **М.Левкова**, S.Banka, М.Цветкова, Д.Константнова, Л. Ангелова. *Диагностични и диференциално-диагностични предизвикателства при поставяне на рядка генетична диагноза синдром на Кабуки – представяне на случай*. сп. Педиатрия, бр.1, ISSN, 2019, 51-54. Q4
	* **Резюме:** Въведение: Редките заболявания (85 % с генетичен произход) се характеризират с клинична и генетична хетерогенност, поради което диагнозата често се поставя със закъснение (средно 7 години) или е невъзможно да бъде установена. Материали и методи: Представяме случай на пациент с множество аномалии в развитието и дисморфизъм, който по-късно е диагностициран със синдрома на Кабуки. Прегледът на литературата разкрива исторически данни и допълнителна информация за същността на заболяването. Представени са различни налични диагностични схеми, включително наскоро публикувани международни консенсусни критерии. Резултати: В процеса на диференциална диагноза на представения случай бяха разгледани шест различни синдрома въз основа на съвкупността от налични клинични признаци. Целенасоченият ДНК анализ за мутации в гена KMT2D, свързани с предполагаемото заболяване, потвърждава синдрома на Кабуки, когато пациентката е била вече на 13-годишна възраст, въпреки че първите симптоми са били налични в неонаталния период. Заключение: Диагностицирането на пациент с рядко заболяване често е трудна задача. Трудностите произтичат от недостига на клиницисти (дисморфолози) с дълбоки познания в областта на редките синдроми, както и от финансовите и организационните проблеми на генетичните анализи. Често диагнозата при такива пациенти се поставя със закъснение или остава клинично неразпозната и/или непотвърдена на молекулярно-генетично ниво.
	* **Abstract:** Background: Rare diseases (85% of genetic origin) are characterized by clinical and genetic heterogeneity, so that the diagnosis is often delayed (on average 7 years) or impossible to identify. Materials and methods: We present a case of a patient with multiple developmental abnormalities and dysmorphism, who was later diagnosed with Kabuki syndrome. The review of the literature reveals historical data and additional information for the essence of the disorder. Various diagnostic schemes available, including recently published international consensus criteria, are presented. Results: In the differential diagnosis process of the presented case, six different syndromes were considered, based on the constellation of available clinical signs. A targeted DNA analysis for mutations in KMT2D gene associated with the suspected disease confirmed Kabuki's syndrome in the patient at the age of 13, although the first symptoms were presented in the neonatal period. Conclusions: Diagnosing a patient with a rare disease is often a difficult task. Difficulties arise from a shortage of clinicians (dysmorphologists) with deep knowledge in rare syndromes, and financial and organizational issues of genetic analyses. Often the diagnosis in such patients is delayed or remains clinically unrecognized and / or unconfirmed at molecular genetic level.
3. Хачмериян М., **М.Левкова**, М.Стоянова, В.Митева, Л.Ангелова. *Предизвикателства на медико-генетичната консултация в ерата на геномната медицина*. Обща медицина. XXI, бр.6, 2019, 37-40. Q4
	* **Резюме:** Благодарение на развитието на биотехнологиите през последните няколко десетилетия клинико-генетичните услуги напредват значително. Възможностите за анализ се разширяват, молекулярната етиология на редица редки заболявания се разкрива. Поради особеностите на генетичните резултати, възможностите и ограниченията на използваните технологични методи и спецификата на коментираната патология, широко се дискутира необходимостта от предоставяне на пре- и постаналична генетична консултация, с цел да се подпомогнат разбирането и адаптацията към медицинските, психологичните и фамилните последици от наличното заболяване. С популяризирането на този тип анализи, се увеличава и предлагането, като често се заобикаля традиционната здравна система. Общопрактикуващите лекари, както и всички други медицински кадри, съвсем скоро и у нас, ще бъдат изправени пред проблема как да интерпретират и използват информацията, получена от пряко към потребителя генетично тестване. Целта на настоящата статия е да запознае и подготви за очакваните предизвикателства в условията на все по-зачестяващите генетични анализи в ерата на геномната медицина.
	* **Abstract:** As a result of the recent progress in biotechnology, clinical-genetic services have been improved. The possibilities of genetic analyses have expanded, the underlying molecular etiology of some rare diseases has been revealed. Due to specificity of genetic analyses, the possibilities and limitations of the applied technologies and the specific genetic pathology, the necessity of pre- and post-test genetic counseling is widely discussed. Its aim is to help the patients and their families to understand and adapt to the medical and psychological effects of the disease. With the increasing popularity of genetic testing, the variety of offers is increasing, often bypassing the traditional healthcare systems. General practitioners, as well as all the other medical stuff in our country, will soon face the problem how to interpret and use the information received from direct-to-consumer genetic testing in the clinical practice. The purpose of this article is to introduce and prepare for the anticipated challenges in the face of increasing genetic analyses in the era of genomic medicine.
4. **M.Levkova**, T.Chervenkov, L.Angelova. *The association of gr/gr deletion in the Y chromosome and impaired spermatogenesis in Bulgarian males: a pilot study*. Middle East Fertility Society Journal, 2020, 25(1), Article number:10, 1-15. Q3
	* **Резюме:** Въведение: Микроделециите на Y хромозомата се свързват с намален брой сперматозоиди в еякулата и мъжки инфертилитет. Такава делеция е gr/gr, която води до намаляване на алелите в гена DAZ. За да се оцени ролята й, 30 пациенти с брой сперматозоиди под 5 × 106/ml и 30 нормални фертилни мъже бяха генотипирани за микроделеции в AZF региона, включително за делецията gr/gr. Резултати: Двадесет и един мъже (70,00%) от пациентите с нарушена фертилност са имали нормален генотип, седем мъже (23,33%) са били носители на делеция gr/gr, а двама мъже (6,67%) са показали делеция на AZFc областта. От контролната група 22 мъже (73,33%) нямаха делеция, седем (23,33%) носеха gr/gr делеция, а един мъж (3,33%) носеше възможна делеция в областта b1-b4 на Y хромозомата. При делецията gr/gr на Y хромозомата се наблюдава статистически незначима разлика (p = 0,94, алфа < 0,05) с контролната група (Хи-квадрат, степени на свобода 0,006). Заключение: Резултатите от изследването не показват връзка между тази делеция и мъжкия инфертилитет в изследваната популация. Въпреки малкия размер на извадката, високата честота на gr/gr делецията, установена в контролната група, предполага, че този вариант може да не е свързан с нарушена сперматогенеза.
	* **Abstract:** Background: The microdeletions of the Y chromosome are associated with a decreased number of sperm cells in the ejaculate and male infertility. One such deletion is the gr/gr, which leads to reduction of the alleles in the DAZ gene. In order to evaluate its role, 30 patients with sperm count below 5 × 106/mL and 30 normal fertile men were genotyped for microdeletions in Azoospermia Factor (AZF) region, including gr/gr deletion. Results: Twenty-one men (70.00%) from the males with impaired fertility had a normal genotype, seven men (23.33%) were carriers of a gr/gr deletion, and two men (6.67%) demonstrated a deletion of the AZFc region. From the control group, there were 22 men (73.33%) with no deletion, seven (23.33%) carried a gr/gr deletion, and one man (3.33%) carried a possible deletion in the b1-b4 region of the Y chromosome. The gr/gr deletion of the Y chromosome showed a statistically nonsignificant difference (*p* = 0.94, alpha < 0.05) with the control group (chi-square, degrees of freedom 0.006). Conclusion: The results from the research show no association between this deletion and male infertility in the studied population. Despite the small sample size, the high frequency of the gr/gr deletion, found in the control group, suggests that this variant may not be associated with impaired spermatogenesis.
5. Tsvetkova M., **M.Levkova**, S.Tsvetkova, M.Hachmeriyan, E.Kovachev, L.Angelova. *Double aneuploidy 48,ХХХ,+21 of a Bulgarian newborn with Down phenotype: a case report*. Egyptian journal of Medical Human Genetics, 2020, 21(1), pp.1-5. Q4
	* **Резюме:** Въведение: Анеуплоидията е една от най-важните хромозомни аберации, която включва абнормен брой хромозоми. Тризомия 21 (синдром на Даун) и бройните аберации на половите хромозоми са с относително висока честота на разпространение сред общото население. Пациентите обаче обикновено имат едно от горепосочените генетични нарушения, а комбинираните случаи на две различни тризомии са необичайни. Представяне на случая: Съобщаваме за случай на пациент с двойна анеуплоидия - комбинация от тризомия 21 и допълнителна Х хромозома (47,ХХХ). Пробандът е имал типични лицеви характеристики на синдрома на Даун и не е проявявал никакви симптоми на полизомия Х. Пациентката е имала хипотония, сърдечен дефект и пръстеновиден панкреас. Поставена е клинична диагноза синдром на Даун, но цитогенетичният анализ установява две свободни пълни тризомии - тризомия 21 (синдром на Даун) и полизомия Х. Заключение: Случаите на двойна анеуплоидия, съчетаваща тризомия 21 и тризомия по полова хромозома, могат да бъдат предизвикателство, тъй като пациентите проявяват само симптоми, типични за синдрома на Даун. Откриването на втора пълна свободна тризомия Х в нашия случай беше случайно откритие. Това показва важността на цитогенетичния анализ, въпреки очевидния фенотип на тризомия 21.
	* **Abstract:** Background: Aneuploidy is one of the most important chromosomal aberrations, which involves an abnormal number of the chromosomes. Trisomy 21 (Down syndrome) and numerical aberrations of the sex chromosomes have a relatively high prevalence in the general population. However, the patients usually have one of the above genetic disorders and combined cases of two different trisomies are unusual. Case presentation: We report a case of a patient with double aneuploidy—a combination of trisomy 21 and triple X syndrome. The proband had typical features of Down syndrome and did not manifest any symptoms of polysomy X. The patient had hypotonia, a cardiac defect, and an annular pancreas. A clinical diagnosis of Down syndrome was established, but the cytogenetic analysis found two free full trisomies - trisomy 21 (Down syndrome) and triple X. Conclusion: Cases of double aneuploidy, combining trisomy 21 and trisomy of a sex chromosome, could be challenging because the patients manifest only symptoms, typical for Down syndrome. The discovery of a second complete free trisomy X in our case was an incidental finding. This illustrates the importance of the cytogenetic analysis, despite the evident phenotype of trisomy 21.
6. Стоянова, М, **М.Левкова**, М.Хачмерян, В.Стоянов, В.Младенов, Л.Ангелова. *Случай на синдром на Bardet-Biedl – клинична и генетична диагноза*. Сп.Педиатрия, том 60, бр.3, 2020, 38-40. Q4
	* **Резюме:** Синдромът на Bardet-Biedl (BBS) е рядкa автозомно-рецесивна цилиопатия, характеризираща се с клинична и генетична хетерогенност. Представяме случай на петгодишно момиче, при което съчетанието на постаксиална полидактилия, изоставане в НПР и затлъстяване насочи към вероятна диагноза BBS, потвърдена молекулярно-генетично. Случаят илюстрира поетапната поява на типичните за заболяването клинични прояви, което би могло да затрудни и забави поставянето на точната диагноза. Тя е предимно клинична, базираща се на покриването на основни и второстепенни критерии, но може да бъде потвърдена и молекулярно-генетично в около 80% от засегнатите. Важно е познаването на това рядко заболяване, тъй като ранната диагноза и мултидисциплинарният подход значително биха намалили заболеваемостта и смъртността и са от значение за достигане на възможно най-голям потенциал при децата с този синдром.
	* **Abstract:** Bardet-Biedl syndrome (BBS) is a rare autosomal recessive ciliopathy, characterized by clinical and genetic heterogeneity. We present a case of a five-year old girl, who had postaxial polydactyly, developmental delay and obesity. Based on these symptoms, she was diagnosed with BBS and later it was confirmed by molecular genetic analysis. This case illustrates the gradual onset of the typical symptoms, which could cause difficulties and delay the diagnostic process. In most of the cases, it is a clinical diagnosis, based on the score of primary and secondary criteria, but it could be confirmed by a molecular genetic analysis in around 80% of the affected individuals. It is important to be informed of this rare genetic condition, because the early diagnosis and the multidisciplinary approach would significantly reduce the morbidity and mortality. Also, they would allow the children with BBS to reach their highest potential.
7. М. Хачмериян, М. Стоянова, **М. Левкова**, С. Галчева, Д. Авджиева, Т. Делчев, Й. Тихонова, В. Йотова, Л. Ангелова. *Синдром на Корнелия де Ланге – представяне на класически и некласически вариант*. сп.Педиатрия, 2020, бр. 4 стр. 2- 5 Q4
	* **Резюме:** Синдромът на Корнелия де Лангe е рядко генетично заболяване от групата на кохезинопатиите, характеризиращо се с клинична и генетична хетерогенност, поради което често поставянето на точна диагноза, особено в случаи с дискретен фенотип, е затруднено. Представяме двама пациенти, които демонстрират широкия фенотипен спектър на синдрома. Оценката на клиничната изява в двата случая е базирана на първия официално публикуван интернационален консенсус за диагностичните критерии при синдром на Корнелия де Ланге, който класифицира клиничните белези в две групи - основни (считани за най-характерни) и насочващи. Диагностицирането на рядко генетично заболяване дори и с добре познат дисморфизъм поражда затруднения. Представените клинични случаи акцентират върху необходимостта активно да се използва инструментариума на интернационалния консенсус за синдром на Корнелия де Ланге дори в случаи с дискретен фенотип.
	* **Abstract:** Cornelia de Lange syndrome is a rare genetic disorder, a cohesinopathy characterized by clinical and genetic heterogeneity, which makes an accurate diagnosis difficult, especially in cases with a discrete phenotype. We present two patients, who demonstrate a broad phenotypic spectrum of the syndrome. Clinical score in both cases is based on the first officially published consensus statement for Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome, which classifies clinical features into two groups - cardinal features and suggestive. Diagnosis of a rare genetic disease, even with well-known dysmorphism, could be difficult. The two clinical cases emphasize on the need of applying the published consensus statement for Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome even in cases with a discrete phenotype.
8. **Levkova, M.**, Stoyanova, M., Staneva, R., Hachmeriyan, M., Angelova, L. (2021). *16p11. 2 Duplication Syndrome-a Case Report*. Folia Medica, 63, 138. Q4
	* **Резюме:** 16p11.2 дупликация синдромът е рядко срещано заболяване, което често се свързва с интелектуална недостатъчност, дефицит на вниманието, хиперактивност и предразположение към епилепсия и шизофрения. За това генетично заболяване няма специфични дисморфични характеристики, но може да се наблюдават микроцефалия, микрогнатия и хипертелоризъм. Съобщаваме за случай на 16p11.2 дупликация синдром, който има типичната клинична картина - лек лицев дисморфизъм, нарушено интелектуално развитие и аутистично поведение. Извършено е целоекзомно секвениране, но не са идентифицирани патогенни или вероятно патогенни мутации. Анализът чрез сравнителна геномна хибридизация установява диагнозата 16p11.2 дупликация синдром, което показва важността на този метод при диагностицирането на деца с необясним интелектуален дефицит.
	* **Abstract:** 16p11.2 duplication syndrome is a rare disorder, often associated with intellectual disability, attention deficit, hyperactivity disorder, and a predisposition to epilepsy and schizophrenia. There are no specific dysmorphic features for this genetic condition, but microcephaly, micrognathia and hypertelorism could be present. We report a case of 16p11.2 duplication syndrome which has the typical clinical presentation – slight facial dysmorphism, impaired intellectual development, and autistic behavior. Whole-exome sequencing was performed, but no pathogenic or likely pathogenic mutations were identified. Array comparative genomic hybridization analysis established the diagnosis of 16p11.2 duplication syndrome, which illustrates the importance of this method when diagnosing children with unexplained intellectual disability.
9. M. Stoyanova, M. Hachmeriyan, **M. Levkova**, S. Bichev, M. Georgieva, V. Mladenov, L. Angelova. Molecular screening for Fragile X among children with unexplained intellectual disability and/or autistic behavior. Folia Medica, 64, no. 1 (2022): 27-32. Q4
	* **Резюме:** Въведение: Синдромът на чупливата Х (FXS, OMIM #300624) е най-често срещаната наследствена форма на интелектуален дефицит и водещата моногенна причина за аутизъм. Цел: Да представим нашия опит със селективен скрининг за FXS сред високорискови деца с интелектуална недостатъчност/забавяне в развитието/аутистично поведение и да докажем допълнително значението на провеждането на селективен скрининг при високорискова популация. Материали и методи: Петдесет и две деца (45 момчета и 7 момичета), хоспитализирани в педиатрични клиники или насочени към кабинета за генетично консултиране, бяха изследвани с търговски кит, базиран на PCR за търсене на тринуклеотидини повтори. Средната възраст на участниците беше 6 години (най-малкият беше на 2 години, а най-възрастният - на 15 години). Тези пациенти са избрани въз основа на наличието на поне една от следните клинични характеристики: забавяне на развитието, интелектуален дефицит и аутистично поведение. Резултати: Всички пациенти имат забавяне в развитието, включително езиково забавяне. Интелектуалният дефицит и аутистичното поведение са най-често срещаните характеристики. Тридесет и три деца (63,4%) са с интелектуални затруднения. Аутизъм и аутистично поведение са наблюдавани при 22 пациенти (42,3%). Само при 9 пациенти от мъжки пол (17,3%) се наблюдават дисморфични характеристики, типични за FXS. Установено е, че три момчета (5,7%) са засегнати, а две от майките им са носителки на премутация. Заключение: Настоящото проучване е първият опит за молекулярно-генетичен селективен скрининг за FXS сред високорискови групи в Североизточна България. Скринингът за FXS помага за поставяне на окончателна диагноза, както и за предоставяне на генетично консултиране на семейството, което включва репродуктивно планиране и оценка на риска.
	* **Abstract:** Introduction: Fragile X syndrome (FXS, OMIM #300624) is the most common inherited form of intellectual disability and the leading monogenic cause of autism. Aim: To present our experience with selective screening for FXS among high-risk children with intellectual disability/developmental delay/autistic behavior and to further prove the importance of performing selective screening in a high-risk population. Materials and methods: Fifty-two children (45 boys and 7 girls) hospitalized in pediatric clinics or referred to genetic counseling services were tested with triplet repeat primed PCR based commercial kit. The mean age of participants was 6 years (the youngest was 2 years old, the oldest - 15 years old). These patients were selected based on the presence of at least one of the following clinical features: developmental delay, intellectual disability, and autistic-like behavior. Results: All patients presented with developmental delay, including language delay. Intellectual disability and autistic-like behavior were the most consistent features. Thirty-three children (63.4%) were with intellectual disability. Autism and autistic-like behavior were observed in 22 patients (42.3%). Only 9 male patients (17.3%) presented with dysmorphic features typical for FXS. Three boys (5.7%) were found to be affected and two of their mothers - premutation carriers. Conclusions: The present study is the first attempt for molecular genetic selective screening for FXS among high-risk groups in north-eastern Bulgaria. Screening for FXS helps in making a definitive diagnosis along with providing genetic counseling to the family which includes reproductive planning and risk assessment.
10. М.Стоянова, М. Цветкова, **М. Левкова**, В. Митева, Д. Яхя, В. Йотова, М. Георгиева, Л. Ангелова. *Цитогенетични изследвания при деца – опитът на Лаборатория по медицинска генетика - Варна за период от 10 години*. сп. Педиатрия, 2021;61(2) Q4
	* **Резюме:** Хромозомните аномалии са важна причина за множество малформативни синдроми и нарушение във физическото, нервно-психическото, умственото и половото развитие. Цел: Да се представят резултатите от проведен цитогенетичен анализ като метод за диагностика при деца със съмнение за хромозомна патология на база на данните на Лабораторията по медицинска генетика - Варна за 10-годишен период от време. Материал и методи: Извършен е ретроспективен анализ на цитогенетичните находки на деца, изследвани в генетичната лаборатория за периода 2010 - 2019 г. Проведен е цитогенетичен анализ върху биологичен материал от периферна кръв на 1781 деца (658 момичета и 1123 момчета) на възраст 0 - 18 г. (средна възраст 5.5 г.) със съмнение за хромозомна патология. Резултати: Патологичен кариотип е установен при 275 (15%) от общо 1781 изследвани деца, като в 10% се касае за бройна хромозомна аберация. Тризомия 21 е най-често разкриваната хромозомна патология - 137 деца (50%). Аберации по половите хромозоми са открити при общо 36 деца (13%), от които при 20 момичета (7%) се установява броен или структурен вариант на синдром на Търнър. В 76 (28%) случаи се касае за структурни автозомни хромозомни нарушения, като преобладават небалансираните аберации - 51 случаи (19%). Заключение: Обобщените данни от нашето проучване показват, че конвенционалният цитогенетичен анализ има своето място в диагностичния процес при определени показания и негово важно предимство пред молекулярно-генетичните методи е възможността за откриване на мозаицизъм, както и балансирани преустройства.
	* **Abstract:** Chromosomal abnormalities are an important cause of many malformative syndromes and disorders in physical, neuro-mental, mental and sexual development. Aim: To present the results of cytogenetic analysis as a diagnostic method in children with suspected chromosomal pathology based on the data of the Medical Genetics Laboratory - Varna for a 10-year period. Material and Methods. A retrospective analysis of the cytogenetic findings of children tested in the genetic laboratory for the period 2010 - 2019 was performed. Cytogenetic analysis was performed on peripheral blood samples of 1781 children (658 girls and 1123 boys) aged 0 - 18 years (mean age 5.5 years) with suspected chromosomal pathology. Results: 275 (15%) out of 1781 examined children were found to have abnormal karyotype, 10% of them had numerical chromosomal aberration. Trisomy 21 was the most frequently detected chromosomal pathology - 137 children (50%). Sex chromosome aberrations were found in a total of 36 children (13%), of whom 20 girls (7%) were found to have a numerical or structural variant of Turner syndrome. In 76 (28%) cases structural autosomal chromosomal disorders were present, with unbalanced aberrations predominating in 51 (19%) cases. Conclusion: The summarized data from our study show that conventional cytogenetic analysis has its place in the diagnostic process in certain indications and its important advantage over molecular genetic methods is the ability to detect mosaicism as well as balanced rearrangements.
11. Angelova L, Tsvetkova M, **Levkova M**. *Chromosomal polymorphism in Bulgarian patients with reproductive problems – one genetic centre experience*. Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers, 2021;27(4):4133-4138. Q3
	* **Резюме:** Хромозомният полиморфизъм се описва като нормални варианти в хромозомни области без влияние върху фенотипа, но с възможна връзка с инфертилитета и повтарящите се спонтанни аборти. Целта на това проучване е да се оцени влиянието на хромозомните полиморфизми, които се наблюдават в семейства с репродуктивни неуспехи в българската популация. Материал и методи: Общо 1733 пациенти с необясними репродуктивни неуспехи, посетили Лабораторията по медицинска генетика - Варна, България, (2004 - 2019 г.), бяха изследвани чрез конвенционални цитогенетични анализи GTG и CBG диференциални бендинг техники и анализирани с резолюция 400-550 GTG бенда. Резултати: Хромозомни полиморфизми са открити при 173 пациенти с инфертилитет (9,98%). Разпределението по пол е следното: 6,52% мъже и 3,46% жени. Най-често срещаната находка е inv(9)(qh) (23,7%). Другите открити хромозомни варианти са: варианти 9qh+/- (15,1%); полиморфизми на късите рамена на акроцентричните хромозоми (21,4%); 16qh+ (12,7%) и 1qh+ (6,9%). Полиморфизъм на Y-хромозомата е открит при 27,4% от мъжете с полиморфизми. Открити са и два редки случая на полиморфизъм, засягащ центромерните области - 19qcenh+ и 20pcenh+. Заключение: Налице са все повече доказателства, че полиморфизмите могат да имат клинично въздействие върху фертилитета и да участват в етиологията на инфертилитета. В това проучване открихме значително висок процент полиморфизми (9,98%) сред изследваните пациенти, като те са по-често срещани сред мъжете. Статистическата значимост на повишената честота на хромозомните вариации, установена в нашето проучване, подчертава необходимостта от рутинна оценка на тяхната роля в семействата с инфертилитет в нашата страна.
	* **Abstract:** Chromosomal polymorphism is described as normal variants at chromosomal regions with no impact on the phenotype but a possible correlation to infertility and recurrent spontaneous abortions. The aim of this study was to evaluate the effect of the chromosomal polymorphisms involved in families with reproductive failures in the Bulgarian population. Material and methods: A total of 1733 patients with unexplained reproductive failures who visited the Laboratory of Medical Genetics – Varna, Bulgaria, (2004 - 2019) were investigated by conventional cytogenetic analysis GTG and CBG differential banding techniques and analyzed at the resolution 400-550 GTG bands. Results: Chromosomal polymorphisms were found in 173 infertile patients (9,98%). The sex distribution was 6,52% males and 3,46% females. The most frequent finding was inv(9)(qh) (23,7%). The other chromosomal variants, which were found, consisted: 9qh+/- variants (15,1%); polymorphisms on the short arms of the acrocentric chromosomes (21,4%); 16qh+ (12,7%) and 1qh+ (6,9%). Y chromosome polymorphism was found in 27,4% of the males with polymorphisms. Two rare cases of polymorphism involving the centromere regions - 19qcenh+ and 20pcenh+ were also found. Conclusion: There is growing evidence that polymorphisms may have a clinical impact on fertility and could take part in the etiology of RF. In this study, we found a significantly high percentage of polymorphisms (9,98%) among the tested patients, and they were more common among males. The statistical significance of increased incidence of chromosome variations found in our study emphasizes the need for routine evaluation of their role in families with RF in our country.
12. Levkova M., Т.Chervenkov, М.Hachmeriyan, L.Angelova. *CFTR gene variants as a reason for impaired spermatogenesis: a pilot study and a meta-analysis of published data*, Human Fertility. 2021 Mar 6:1-0. (IF 2.161) Q3
	* **Резюме:** Все повече данни сочат, че вариантът IVS8-5T и TG повторите могат да доведат до нарушена сперматогенеза. За да проучим това, извършихме секвениране по Sanger на 50 български мъже с брой сперматозоиди под 5 x 106 /mL и 20 нормални фертилни мъже. Честотите на резултатите бяха сравнени между двете групи. Извършен е мета-анализ, като са използвани данните за 6423 пациенти и 5834 контролни лица, изследвани за полиморфизма IVS8-5T. Един пациент (2,0%) е хомозигот за варианта 5T/5T, а двама (4,0%) са хетерозиготи за варианта 5T/7T. В контролната група не са открити алели 5Т. Генотиповете на двете групи показват статистически значима разлика (p = 0,04, a < 0,05). Също така отношението на шансовете е 3,73, но то е несигнификантно (p = 0,38). Всички контролни субекти са имали 11 TG повтора, а при тестовата група: 47 (94,0%) мъже са с 11 TG повтора и трима (6,00%) с 10 TG повтора. Тестът на Фишер не показа статистически значима разлика (p = 0,55). Мета-анализът показва, че вариантът IVS8-5T е рисков фактор за нарушена сперматогенеза (OR = 2,84, p < 0,05) и това е по-силно изразено при неевропейските (OR = 4,50, p < 0,05) в сравнение с европейските (OR = 1,28, p < 0,05) мъже. Вариантът IVS8 - 5 T може да бъде свързан с нарушения в производството на сперматозоиди
	* **Abstract:** There is increasing data that IVS8-5T variant and TG repeats could lead to impaired spermatogenesis. To investigate this, we performed Sanger sequencing on 50 Bulgarian men with a sperm count below 5 x 106 /mL and 20 normal fertile men. Frequencies of the results were compared among the two groups. A meta-analysis was performed by using the data for 6,423 patients and 5,834 control subjects, tested for the IVS8-5T polymorphism. One case subject (2.0%) was homozygote for the 5 T/5T variant whereas two (4.0%) were heterozygotes for the 5 T/7T variant. No 5 T alleles were found in the control group. The genotypes of the two groups showed a statistically significant difference (p = 0.04, a < 0.05). Also, the odds ratio was 3.73, but this was unsignificant (p = 0.38). All control subjects had 11 TG repeats and for the test group: 47 (94.0%) men with 11 TG repeats and three (6.00%) with 10 TG repeats. Fisher’s test showed no significant difference (p = 0.55). The meta-analysis showed that IVS8-5T variant was a risk factor for impaired spermatogenesis (OR = 2.84, p < 0.05) and this was more prominent for non-European (OR = 4.50, p < 0.05) compared to European (OR = 1.28, p < 0.05) men. The IVS8 - 5 T variant could be associated with disorders of sperm production.
13. **Levkova M**.,Stoyanova M., Benkova-Petrova M., Georgieva M., Angelova L. *Variants of uncertain significance in the era of next generation sequencing*. Journal of the American Association of Nurse Practitioners. 2022 Jun 22; 10-1097 (IF 1.370) Q2
	* **Резюме:** Секвенирането от следващо поколение (NGS) вече се използва повсевместно при диагностицирането на редки заболявания. Въпреки това то има някои ограничения, като например вариантите с неясно значение (VUS). Това може да създаде трудности дори за специлизираните медицински сестри, които се занимават с клинична генетика. Представяме три случая от нашата клинична практика: два таргетни панелни анализа и едно екзомно секвениране. Взетите кръвни проби са изпратени за NGS анализ. В случай 1 е открит VUS в гена *LITAF*, който се свързва с автозомно-доминантната болест Charcot-Marie-Tooth тип 1C. При случай 2 е докладван VUS в гена *MEFV*, който се свързва с автозомно-рецесивна и автозомно-доминантна фамилна средиземноморска треска. В тези случаи отчетеният VUS съответства на клиничната диагноза. В случай 3 са открити два варианта в хетерозиготно състояние в гена *ATP7B*, който се свързва с болестта на Уилсън, и по-късно заболяването е клинично диагностицирано. Според публикуваните насоки, VUS не трябва да се обсъждат като причина за наблюдаваното генетично състояние. Независимо от това, ако докладваният вариант е в ген, свързан с клинично диагностицираното нарушение, и има силна корелация между генотип и фенотип, това може да подсказва за етиологичната роля на този вариант.
	* **Abstract:** Next-generation sequencing (NGS) is now widely used in diagnosing rare diseases. However, it has some limitations, such as variants of uncertain significance (VUS). This can present difficulties even for nurse practitioners involved in clinical genetics. We present three cases from our clinical practice: two targeted panel testing and one exome sequencing. Whole blood samples were collected and sent for NGS analysis. In case 1, a VUS was found in the *LITAF* gene, which is associated with autosomal dominant Charcot–Marie–Tooth disease type 1C. In case 2, a VUS was reported in the *MEFV* gene, which is associated with autosomal recessive and autosomal dominant familial Mediterranean fever. In these cases, the reported VUS corresponded to the clinical diagnosis. In case 3, two variants in the heterozygous state were found in the *ATP7B* gene, which is associated with Wilson disease, and the disorder was later clinically recognized. According to the published guidelines, VUSs should not be discussed as a cause for an observed genetic condition. Nevertheless, if the reported variant is in a gene associated with the clinically diagnosed disorder, and there is a strong genotype-phenotype correlation, it could be suggestive of the etiological role of this variant.
14. Tsalta-Mladenov, M., **Levkova, M**., Georgieva, D. and Andonova, S., 2023. *Congenital myasthenic syndrome due to a genetic mutation*. Journal of the American Association of Nurse Practitioners, pp.10-1097 (IF 1.495) Q2
	* **Резюме:** Вроденият миастеничен синдром (ВМС) представлява група от редки генетични заболявания, които имитират симптомите на миастения гравис, но се дължат на генетичен дефект. Представяме случай на пациент със ВМС от мъжки пол и хода на заболяването през годините. Първоначално пациентът се представя с генерализирана мускулна слабост и затруднено преглъщане. По време на проследяването се появяват затруднения в дъвченето, двустранна външна офталмопареза с почти пълно блокиране на очните движения и булбарен синдром. Случаят илюстрира както клиничната хетерогенност, така и прогресивното влошаване на симптомите на заболяването през годините. Оптималното лечение на ВМС се основава на молекулярния дефект и неговата локализация в нервно-мускулното съединение. В нашия случай лечението с пиридостигмин доведе до добър дългосрочен контрол на симптомите. В резултат на доброто спазване на лечението пациентът не бил приеман в болница поради респираторен дистрес. Липсата на универсален протокол за лечение на ВМС подчертава нуждата от персонализиран подход при работата с пациенти с реди заболявания.
	* **Abstract:** Congenital myasthenic syndrome (CMS) is a group of rare genetic disorders that mimics the symptoms of myasthenia gravis, but it is due to a genetic defect. We present a case of a male CMS patient, and the course of the disease through the years. The patient initially presented with generalized muscle weakness and difficulty swallowing. During the follow-up, he developed difficulty in chewing, bilateral external ophthalmoparesis with an almost full block of eye movements and bulbar syndrome. The case illustrates both the clinical heterogeneity and the progressive worsening of the symptoms of the disease over the years. The optimal treatment for CMS is based on the molecular defect and its localization in the neuromuscular junction. In our case, treatment with pyridostigmine resulted in good long-term control of symptoms. As a result of the patient’s good compliance with treatment, he was not admitted to hospital because of respiratory distress. The lack of a unified protocol for the treatment of CMS highlights the need for a more personalized approach when dealing with patients with rare diseases.
15. **Levkova M**, Chervenkov T, Pancheva R. *Genus-Level Analysis of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Mini Review*. Children. 2023; 10(7):1103. https://doi.org/10.3390/children10071103 (IF 2.4) Q2
	* **Резюме:** Аутизмът е глобален здравен проблем, който вероятно се дължи на комбинация от генетични фактори и фактори на околната среда. Появяват се данни, че чревният микробиом на децата с аутизъм се различава от този на нормално развиващите се деца и е важно да се знае кои бактериални родове могат да бъдат свързани с аутизма. Проведохме търсене в различни бази данни, като използвахме специфични ключови думи и критерии за включване, и определихме десетте най-чести бактериални рода от избраните статии, които се различават значително между изследваните пациенти и изследваните контролни субекти. Идентифицирани бяха общо 34 проучвания, които отговаряха на критериите за включване. Родовете *Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Coprococcus, Faecalibacterium, Lachnospira, Prevotella, Ruminococcus, Streptococcus* и *Blautia* показаха най-много данни, показващи, че техните колебания в стомашно-чревния тракт могат да бъдат свързани с етиологията на аутизма. Вероятно симптомите на аутизъм се влияят както от повишените нива на вредните бактерии, така и от понижените нива на полезните бактерии. Интересно е, че тези родове демонстрират различни модели на повишени или понижени нива в различните статии. За да се потвърдят и отстранят източниците на тези колебания, са необходими допълнителни изследвания. Следователно бъдещите изследвания на причините за аутизма трябва да се съсредоточат върху изследването на бактериалните родове, разгледани в настоящата публикация.
	* **Abstract:** Autism is a global health problem, probably due to a combination of genetic and environmental factors. There is emerging data that the gut microbiome of autistic children differs from the one of typically developing children and it is important to know which bacterial genera may be related to autism. We searched different databases using specific keywords and inclusion criteria and identified the top ten bacterial genera from the selected articles that were significantly different between the studied patients and control subjects studied. A total of 34 studies that met the inclusion criteria were identified. The genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, and *Blautia* exhibited the most substantial data indicating that their fluctuations in the gastrointestinal tract could be linked to the etiology of autism. It is probable that autism symptoms are influenced by both increased levels of harmful bacteria and decreased levels of beneficial bacteria. Interestingly, these genera demonstrated varying patterns of increased or decreased levels across different articles. To validate and eliminate the sources of this fluctuation, further research is needed. Consequently, future investigations on the causes of autism should prioritize the examination of the bacterial genera discussed in this publication.
16. **Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“**
17. **Levkova, M**., Hachmeriyan, M., Miteva, V., Stoyanova, M., & Tsvetkova, M. (2018). *Women’s awareness towards prenatal down syndrome tests in Bulgaria*. J Down Syndr Chr Abnorm, 4(129), 2472-1115.
	* **Резюме:** Цел: През последните няколко години скрининговите и диагностичните тестове за синдрома на Даун се развиха бързо с въвеждането на неинвазивните пренатални тестове (НИПТ). Не всички жени обаче са запознати с новите възможности за изследване. Ето защо целта на нашето проучване е да изследва информираността на жените относно пренаталните тестове за синдрома на Даун в България. Методи: Проучването е проведено сред 500 случайно избрани жени на възраст от 18 до 47 години. То е планирано като проспективно проучване, проведено както онлайн, така и в кабинета за генетично консултиране в Лабораторията по медицинска генетика, Варна. Цялата информация е събрана между януари 2018 г. и юни 2018 г. Резултати: 384 (76,3%) от жените са получили информация за различните възможности за изследване от своя акушер-гинеколог. Останалите 116 (23,7%) са се самоинформирали. Общо 345 (68,5%) от жените са доволни от информацията за тестовете за синдрома на Даун, предоставена от техния акушер-гинеколог. Те са имали по-добри познания за това какво представлява биохимичният скрининг - 128 (25,4 %) са отбелязали много добро ниво, а 207 (41,2 %) - добро. Когато са запитани за теста НИПТ, 202 (40,2 %) не знаят какво е НИПТ. 222 (44,4 %) определят познанията си за амниоцентезата като много добри или добри. Въпреки това само 65 (13,0%) със сигурност биха се подложили на тази процедура, ако имат показания за нея. Според нашите резултати, точността на теста е най-важна при избора на метод за изследване на синдрома на Даун за 346 (68,8%) жени. Въпреки че цената е поставена на трето място като фактор за предпочитане на пренатален тест за синдрома на Даун, почти 80% от анкетираните жени заявяват, че са готови да платят не повече от 150 евро. Заключение: Резултатите от проучването показват липсата на познания за предлаганите скринингови и диагностични тестове за синдрома на Даун, особено за НИПТ. Препоръчва се по-добро обучение и консултиране на жените по време на консултациите им за бременност
	* **Abstract:** Objective: For the past several years the screening and diagnostic tests for Down syndrome have evolved rapidly with the introduction of the non-invasive prenatal testing. However, not all of the women are aware of new test options. That is why the aim of our survey is to investigate the women’s awareness towards prenatal Down syndrome tests in Bulgaria. Methods: А survey was conducted among 500 randomly selected females from 18 to 47. It was designed as a prospective study carried out both online and at the genetic counseling office in the Laboratory of Medical Genetics, Varna. All the information was collected between January 2018 and June 2018. Results: 384 (76.3%) of the women received information about the different tests option from their obstetrician. The rest 116 (23.7%) were self-educated. In total 345 (68.5%) of the females were satisfied with the Down syndrome tests information provided by their obstetrician. They had better knowledge of what biochemical screening is - 128 (25.4%) marked very good and 207 (41.2%) - good. When asked about the NIPT test, 202 (40.2%) did not know what NIPT was. 222 (44.4%) defined their knowledge about the amniocentesis as very good or good. However, only 65 (13.0%) would definitely undergo this procedure, if indicated. According to the results, for 346 (68.8%) women the accuracy of the test is most important when choosing a method for Down syndrome testing. Although the price was placed third as a factor for preferring a prenatal Down syndrome test, almost 80% of the questioned women said that they are willing to pay no more than 150 euros. Conclusion: The results from the survey demonstrate the lack of knowledge about the offered screening and diagnostic tests for Down syndrome, especially NIPT. Better education and counseling of women during their pregnancy consultations are recommended
18. Hachmeriyan, M., Andonova, S., **Levkova, M.**, Stoyanova, M., & Kalchev, K. (2018). *Challenging Reproductive Genetic Counseling in Families at High Risk for Rare Genetic Syndromes–A Case Report with Possible Denys-Drash Syndrome*. J Genet Disor Genet Rep 7, 1, 2.
* **Резюме:** Изчисляването на риска от повторение е неразделна част от ежедневната практика на генетичния консултант, но възникват определени трудности при обясняването му на родителите на дете с рядък дисморфичен синдром. Представяме случай на семейство с първородно новородено с множество аномалии и exitus letalis, регистриран на втория ден. При раждането си бебето има малформации на крайниците. Освен това са диагностицирани спонтанен пневмоторакс, неонатална мозъчна исхемия и интраамниотична инфекция. При аутопсията се установяват допълнителни множество вътрешни малформации, като персистиращ foramen ovale, двурога матка, допълнителна слезка, двустранна хиперплазия на надбъбречните жлези, едностранен тумор на Wilms на левия бъбрек, дифузна гломерулна и интерстициална фиброза и протеинови цилиндри в разширените бъбречни каналчета. Стандартното кариотипиране с GTG бендинг показа нормален мъжки кариотип 46,XY,16qh+, който не съответства на женския фенотип на гениталиите на пациента. Посмъртните находки, заедно с несъответствието между фенотипните полови белези и установения генотип, предполагат синдрома на Денис-Драш като възможна диагноза. Амплификацията на всички екзони, с изключение на екзон 9 на гена WT1, не е успешна при ДНК, извлечена от формалин-фиксирана парафинова тъкан (FFPET). Секвенирането по Sanger на екзон 9 не разкри подлежаща мутация. В настоящия случай тежката неонатална симптоматика и липсата на молекулярно потвърждаване затрудняват даването на сигурна прогноза за риска за повторение. Репродуктивното генетично консултиране при семейства с редки генетични заболявания може да бъде голямо предизвикателство.
* **Abstract:** Calculating the recurrence risk is an integral part of everyday practice of the genetic counselor, but certain difficulties occur when explaining it to the parents of a child with a rare dysmorphic syndrome. We present a case of a family with first newborn with multiple anomalies and exitus letalis, registered on the second day. At birth, the baby presented with limb malformations. Additionally, a spontaneous pneumothorax, neonatal cerebral ischemia, and intraamniotic infection were diagnosed. A post-mortem examination revealed additional multiple internal malformations such as patent foramen ovale, bicornuate uterus, accessory spleen, bilateral adrenal hyperplasia, unilateral Wilm’s tumor of the left kidney, diffuse glomerular and interstitial fibrosis, and protein cylinders in dilated renal tubules. Standard GTG banding karyotyping showed a normal male karyotype 46,XY,16qh+ that did not correspond to the female phenotype of the patient’s genitalia. Postmortem findings together with sex phenotype/genotype discordance suggested Denys-Drash syndrome as possible diagnosis. Amplification of all exons but exon 9 of WT1 gene was not successful on DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) sample. Sanger sequencing of exon 9 did not reveal a causative mutation. In current case the severe neonatal presentation and absence of molecular conformation complicated giving a certain prognosis for the recurrence risk. Reproductive genetic counseling in families with rare genetic conditions could be very challenging.

14.11.2023г. **Подпис:**.....................................

гр. Варна Мария Костадинова Левкова