

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Искра Петрова Алтънкова, дм, дмн.

Относно: дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, Област на висше образование: 7, „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление: 7.1 „Медицина“, Докторска програма: „Имунология“

Тема на дисертационния труд: ”Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при жени с репродуктивни неуспехи“

Докторант: Д-Р СВЕТЛА ОГНЯНОВА БЛАЖЕВА

Научен ръководител: Доц. д-р Емилияна Конова, д.м.

Проф. д-р Галя Ганчева, д.м.

Оценка на актуалността на темата

Развитието на асистираните репродуктивни технологии (ART) през последните десетилетия значително разшири възможностите за лечение на инфертилитет. Въпреки напредъка, честотата на неуспешните опити остава висока. Това обосновава продължаващите изследвания на факторите, влияещи върху ендометриалната рецептивност. Редица проучвания сочат, че имунологичните и микробиомните характеристики на ендометриума играят ключова роля в този процес.

Локалната имунна дисрегулация и микробната дисбиоза в ендометриума биха могли да доведат до отхвърляне на ембриона, или да нарушат подходяща среда за неговото развитие.

Въпреки напредъка в разбирането на тези механизми, към момента липсва единен подход за стандартизирана оценка на ендометриалния имунен профил и микробиома в контекста на ART. Разработването на интегрирани диагностични методи, комбиниращи имунологични и микробиомни анализи, може да допринесе за създаването на персонализирани терапевтични стратегии за подобряване на успеха на имплантацията.

Настоящата дисертация се занимава точно с такива проблеми - от една страна прави “дисекция” на профила на имунните клетки и едновременно с това характеризират на микробиома в ендометриални биопсични проби при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи и загуби на бременност. В този труд докторантката търси потенциала на получените резултати за създаване на клинично използваем обогатен алгоритъм за персонализиран подход към пациентките с репродуктивни проблеми. Това прави настоящата дисертация актуална, научно издържана и с голяма практическа перспектива.

Оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Светла Огнянова Блажева съдържа 183 страници и е структуриран в класическите раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел, и Задачи, Материали и методи, Резултати от собствени проучвания, Обсъждане, Обобщени изводи, и Приноси, Приложения. Илюстриран е с 15 таблици, 21 фигури. Библиографската справка включва 336 източника. Написан е на компетентен и разбираем научен български език. Във връзка с дисертацията са публикувани 4 научни статии и 10 изяви на научни форуми с което работата ѝ е популяризирана сред научната общност.

Литературният обзор е доста обширен и заема 65 страници. Той е структуриран около няколко основни теми, а именно бременността като имунологичен парадокс, ендометриален микробиом, имунна система и женския репродуктивен процес, както и феномени свързани с хроничен ендометрит, влияние на ендометриалния микробиом върху локалните имунни клетки. Включеният литературен материал е съвременен, обстойно и целенасочено представен и осмислен. Добро впечатление прави очертаването и обсъждането на нерешените проблеми в хода на целия обзор, особено тези, които по-нататък се разработват и решават в тази дисертация. Това говори за безспорната лична компетентност на докторанта, но и за опита на неговите научни ръководители. Считам, че горните факти доказват задълбочената образователна и клинична подготовка на докторантката в областите на имунология и репродуктивната медицина.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана, а именно да се определят характеристиките на ендометриалния имунен клетъчен профил и ендометриалната микробиота при жени с повтаряща се имплантационна недостатъчност (RIF) и

повтарящи се загуби на плода (RPL) след АРТ процедури, за да се изясни тяхната роля за репродуктивния успех и възможностите за диагностична оценка и терапевтично повлияване.

Формулирани са 8 **задачи**, които са ясни и целенасочени.

В Глава **Материали и методи** са подробно описани включените в проучването пациентки, използваните методи и апаратура. На места описанията са твърде подробни, но доказват, че д-р Блажева сама е реализирала по-голямата част от разрботката. Очевидно те са усвоени и прилагани от дисертантката, добре са описани. Налице са поне 3 новаторски методи: ендометриални биопсични проби, флоуцитометрично определяне на ендометриални имунни клетки и автоматизиран ДНК анализ на ендометриална микробиота, като всички те са приложени на огромен брой пациентки.

В проучването са включени 200 жени с репродуктивни проблеми, (107 с **RIF** и 97 с **RPL**) пациентки на МЦ КИРМ „Св. Елисавета“, град Плевен. Проучването е одобрено от Комисията по етика за научни изследвания към Медицинския университет в Плевен с решение №698-КЕНИД/03.06.2022 и всички пациентки са подписали доброволно информирано съгласие за участие.

С усвояването и прилагането на тези методи дисертантката реализира значителна образователна дейност, която обогатява нейната квалификация.

Получените резултати са изложени последователно в няколко подраздела на Глава **Резултати**. Те са в значителен обем и са свързани с поставените задачи. Интересен подход е използването на 2 класификации за ендометриалната микробиота:

- според степента на увреждане на микробиотата (предложена от Iwami Nanako и съавт. (2022 г.)
- според вида на микроорганизмите в ендометриалната микробиота (микробен профил.

Авторката е избрала да класира получените данни както за ендометриалната микробиота (като брой ЕМ проби), така и локалните имунни клетки ($\bar{x} \pm SD$) съгласно горните класификации. По този начин тя априори "кръстосва" първичните данни за микробиотите и имунните клетки при цялата група и при двете клинични групи болни. Това позволява да се изследва взаимовръзката между специфичните микроорганизми и ендометриалните имунни клетки. Д-р Блажева съзнава и обективно дискутира ползата на този подход за клиничната практика, но и недостатъците му, като невъзможността да бъдат представени първичните данни, субективност дефинирането на понятията еубиоза и дисбиоза, възможна

временост на резултатите поради еднократните проби, прекалена фрагментация на пациентски подгрупи и др. Получените данни са статистически обработени с класическите методи на вариационния и корелационния анализи и са нагледно представени. Те, обаче, не са достатъчно „мощни“ за обработка на такива големи и разнообразни съобщества, каквито са микробиомните проби, пзследвани при такива големи групи пациенти. По подходящи биха били биоинформационен анализ.

По-важните резултати, получени в този дисертационен труд са:

- Установено е, че при жените с RIF и RPL ендометриална микробиота най-често е значително нарушена. *Candida spp.* се доказва в 86 биопсии.
- В групите с изразена дисбиоза (С и D) е наблюдавано повишение на плазматичните клетки (7.29%) спрямо всички клетки във всички групи с различни количествени различия в микробиотата, както и значимо повече левкоцити, uNK-клетки и CD34+ uNK-клетки при пациентки със „здрав“ микробиом (Група А), в сравнение с дисбиотичните пациентки от Група С.
- Направени са статистически корелации между всички изследвани микробиомни проби и имунните субпопулации в ЕМ. Представени са само статистически значими корелации. Смятам, обаче, че и липата на корелация би могла да има клинична интерпретация. Бъдещ по-„силен“ биоинформационен статистически анализ би могъл да е по-информативен.
- Проследяването на ЕМ клетъчен имунен профил преди и след проведена терапия с антибиотици и пробиотици е показал, че средните стойности на левкоцитите, лимфоцитите, макрофагите, Т-лимфоцитите и прогениторните NK-клетки са по-високи след терапията, но липсва статистическа значимост. Средните стойности на неутрофилите и плазматичните клетки са по-ниски след терапия, но също липсва статистическа значимост.
- Жените с ендометриална биопсия, показваща нормална ЕМ микробиота, демонстрират статистически значимо по-висока раждаемост в сравнение с останалите жени от проучването ($\chi^2(2, n = 200) = 10.053, p = 0.007$).
- Представеният клиничен алгоритъм включва досегашното рутинно поведение в МЦ КИРМ, обогатено с апробираните в дисертацията нови изследвания на ЕМ биопсия и проби за микробиом и имунния клетъчен профил. За съжаление не са представени сравнителни данни от досегашната практика и новия алгоритъм. Изследванията при хронични ендометрити загатват за успешни клинични резултати. По този начин резултатите от тази

дисертация отварят нови перспективи за научни изследвания, което е съществен принос.

Следва доста пространно **Обсъждане** на резултатите, което очертава допълнително значимостта на постиженията.

Изводи и Приноси.

След толкова добре планирана и осъществена работа в дисертационния труд намирам, че **Обобщените изводи** са доста общи и декларативни. Те не съдържат ясно действителните резултати на докторската работа, каквито безусловно тя съдържа. Мисля, че получените резултати и концепции заслужават да бъдат отразени в изводите на дисертационната работа.. Част от тях са формулирани като приноси.

Приноси

Съгласна съм с формулираните приноси в 2 групи с оригинален и потвърдителен характер.

Приноси с оригинален характер

1. Разработена е методика за флоуцитометрично определяне на ендометриални лимфоцитни популации чрез анализ на ендометриални биопсии по време на имплантационния прозорец в лутеалната фаза при жени с репродуктивно нарушение.
2. За първи път в България е приложен комплексен подход за изследване на ендометриални биопсии, комбиниращ молекулярно-генетичен и флоуцитометричен анализ.
3. За първи път в България е анализирано влиянието на ендометриалната микробиота върху локалния имунен отговор чрез разликите в имунните клетки между групите с различен състав на микробиотата при жени с RIF и RPL.
4. За първи път в настоящото проучване е използван метод за групиране на ендометриални биопсии въз основа на състава на микробиотата.

5. За първи път в България е извършено проучване, което оценява патогените от горните генитални пътища и тяхната роля за хроничния ендометрит и ендометриалната дисбиоза при жени с RIF и RPL.

Приноси с потвърдителен характер

1. Средните процентни стойности на левкоцитите, наблюдавани в биопсиите, съответстват на данни от предходни проучвания, доказващи валидността на процедурата за вземане на проби и обработка.
2. Потвърждава се повишената честота на дисбиоза и хроничен ендометрит при жени с RPL и RIF.
3. Потвърждава се влиянието на ендометриалната микробиота върху репродуктивните резултати.
4. Потвърждава се, че ендометриалната микробиота, доминирана от *Lactobacillus* spp., е съществена за оптималната имплантация.
5. Потвърждава се ролята на неутрофилите в ендометриалният имунен отговор при случаите с ендометриална дисбиоза.
6. Потвърждава се терапевтичният ефект на антибиотичната терапия върху хроничния ендометрит и репродуктивния изход.

Биографични данни за д-р Светла Блажева

Д-р Блажева завършва медицина през 2008 г. в МУ-Плевен. Постъпва на работа като лекар в Лаборатория по клинична имунология през 2008г, а от 2016 работи и в МЦ КИРМ „Св. Елисавета“, Плевен, като лекар и консултант. От 2011 г е асистент в МУ-Плевен, Катедра по клинична лаборатория, клинична имунология и алергология. През 2016 г придобива специалност Клинична имунология. През 2024 г. участва в обучителен курс “Tumor-initiated vaccine therapy”, проведен от д-р Каничиро Хасуми в Токио, Япония.

Завършва успешно докторската програма по имунология в периода 2020 – 2024 г.

Във връзка с дисертационния труд са представени 4 научни публикации на английски език, цитирани във Web of Science, Scopus и 10 участия в научни форуми (2 международни и 8 български). Има данни за участие в 2 научни проекта.

Справката, представена от НАЦИД показва, че д-р Блажева успешно покрива минималните изисквания за ОНС „Доктор“.

В предварителното ми **Становище** при апробацията на дисертационния труд пред катедрения съвет предоставих доста бележки и препоръки на дисертантката. Повечето от тях са взети пред вид използвани в окончателният вариант на дисертацията.

В заключение, представената дисертационна работа отговаря на изискванията на Закона за висшето образование и на Правилника на МУ Плевен за растежа на академичните кадри. Проблематиката е актуална и дисертабилна. Трудът разработва комплексно ролята на ендометриалното съдържание на микробиота и имунни клетки при жени с репродуктивни проблеми. Извършена е значителна по обем работа с научна и образователна стойност. Д-р Блажева успешно се развива и квалифицира като лекар и изследовател в областите клинична имунология и репродуктивна медицина. Тези качества на работата и докторантката ми позволяват да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди ОНС „Доктор“ на Д-Р СВЕТЛА ОГНЯНОВА БЛАЖЕВА.

14.05.2025 г.

София

Рецензент: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

/ Проф. д-р И. Алтънкова, д.м.н./

REVIEW

by Prof. Iskra Petrova Altankova, MD, PhD, DSc

Regarding: Dissertation thesis submitted for the award of the educational and scientific degree “Doctor”, Field of Higher Education: 7. Health and Sports, Professional Direction: 7.1 Medicine, Doctoral Program: Immunology

Title of the Dissertation: "Study of the endometrial immune profile and endometrial microbiota in women with reproductive failures"

PhD Student: SVETLA OGNYANOVA BLAZHEVA, MD

Scientific Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Emiliyana Konova, PhD
Prof. Dr. Galya Gancheva, PhD

Relevance of the Topic

The development of assisted reproductive technologies (ART) in recent decades has significantly expanded the options for treating infertility. Despite this progress, the rate of unsuccessful implantation attempts remains high, justifying the ongoing research into the factors affecting endometrial receptivity. Multiple studies indicate that immunological and microbiome characteristics of the endometrium play a key role in this process.

Local immune dysregulation and microbial dysbiosis in the endometrium may lead to embryo rejection or hinder the proper environment for embryo development.

Despite the advances in understanding these mechanisms, there is currently no unified, standardized approach for assessing the endometrial immune profile and microbiota in the ART context. The development of integrated diagnostic methods combining immunological and microbiome analyses may contribute to personalized therapeutic strategies aimed at improving implantation success.

This dissertation addresses just such issues - on the one hand, it "dissects" the immune cell profile and simultaneously characterizes the microbiome in endometrial biopsy samples from women with recurrent implantation failures and pregnancy losses. In this thesis, the PhD student seeks the potential of the results to create a clinically usable enriched algorithm for a

personalized approach to patients with reproductive problems. This makes this thesis relevant, scientifically sound and with a great practical perspective.

Evaluation of the Dissertation

Dr. Svetla Ognyanova Blazheva's dissertation comprises 183 pages and follows the classical structure: Introduction, Literature Review, Aim and Objectives, Materials and Methods, Results, Discussion, General Conclusions, Contributions, and Appendices. It includes 15 tables and 21 figures. The bibliography cites 336 sources. The work is written in competent and clear scientific Bulgarian. Four scientific articles and ten conference presentations have been published in connection with the dissertation, ensuring dissemination of the work within the scientific community.

The literature review is extensive, spanning 65 pages. It is organized around several main themes: pregnancy as an immunological paradox; the endometrial microbiome; the immune system and the female reproductive process; phenomena associated with chronic endometritis; and the influence of the endometrial microbiome on local immune cells. The review presents current material that is well-organized, thoroughly analyzed, and thoughtfully interpreted. Of note is the highlighting of unresolved issues that are later addressed in the dissertation. This reflects the doctoral candidate's competence as well as the expertise of her supervisors. These elements confirm the candidate's deep academic and clinical training in immunology and reproductive medicine.

The aim of the dissertation is clearly formulated, namely to determine the characteristics of the endometrial immune cell profile and the endometrial microbiota in women with recurrent implantation failure (RIF) and recurrent fetal loss (RPL) after ART procedures, in order to clarify their role in reproductive success and the possibilities for diagnostic assessment and therapeutic impact.

Eight tasks have been formulated that are clear and targeted.

The section titled "**Materials and Methods**" meticulously delineates the patient population that was the subject of the study, the methodologies employed, and the apparatus utilized. In certain instances, the descriptions are excessively detailed, yet they substantiate the assertion that Dr. Blazheva was the primary investigator in the execution of the majority of the research. It is evident that the dissertator has thoroughly mastered and applied these concepts, and their discussion is meticulously detailed. There are at least three innovative methods that

have been applied to a significant number of patients. These include endometrial biopsy samples, flow cytometric determination of endometrial immune cells, and automated DNA analysis of endometrial microbiota.

The study included 200 women with reproductive issues (107 with RIF and 97 with RPL), patients at the Medical Center - Clinical Institute for Reproductive Medicine "St. Elisaveta", Pleven. The research was approved by the Ethics Committee of the Medical University of Pleven (Decision №698-KENID/03.06.2022), and all participants provided informed consent.

Mastering and applying these methods reflect substantial academic growth, enhancing the doctoral candidate's qualifications.

The results are systematically presented in several subsections and correspond to the research objectives. An interesting approach is the use of two classifications of the endometrial microbiota:

- According to the degree of dysbiosis (proposed by Iwami Nanako et al., 2022)
- Based on the type of microorganisms (microbial profile)

The author classifies the microbiota data (by biopsy count) and the local immune cell data ($\bar{x} \pm SD$) according to these classifications. Thus, the data for both microbiota and immune cells are cross-analyzed in the entire cohort and in the two clinical groups, enabling the exploration of interactions between specific microorganisms and immune cells. Blazheva, MD, objectively discusses the usefulness of this approach for clinical practice and its disadvantages. These include the inability to present primary data, the subjectivity of defining eubiosis and dysbiosis, the possible temporality of results due to single samples, and the excessive fragmentation of patient subgroups. The data were statistically processed using classical methods of analysis of variance and correlation, and the results are presented visually. However, these methods are not "powerful" enough to handle such large and diverse communities as the microbiome samples studied in large patient groups. A more appropriate method would be bioinformatic analysis.

The most important results obtained in this thesis are:

- Significantly disturbed endometrial microbiota was found in women with RIF and RPL. *Candida spp.* was detected in 86 biopsies.

- In groups C and D, which exhibited marked dysbiosis, there was an increase in plasma cells (7.29%) compared to all other groups. There were also significant quantitative differences in microbiota, as well as a higher number of leukocytes, uNK cells, and CD34+ uNK cells in patients with a "healthy" microbiome (Group A) than in patients with dysbiosis (Group C).
- Statistically significant correlations were made between all microbiome samples examined and immune subpopulations in EM. Only statistically significant correlations are presented. I believe, however, that the correlation lips could have clinical interpretation as well. A future more "robust" bioinformatic statistical analysis could be more informative.
- Monitoring the EM cellular immune profile before and after antibiotic and probiotic therapy revealed higher mean values of leukocytes, lymphocytes, macrophages, T-lymphocytes, and progenitor NK cells after therapy, though these changes were not statistically significant. The mean counts of neutrophils and plasma cells were lower after therapy, but also lacked statistical significance.
- Women with biopsies showing normal microbiota had significantly higher live birth rates compared to others ($\chi^2(2, n = 200) = 10.053, p = 0.007$).
- The presented clinical algorithm incorporates the previous routine management in the MC CIRM, enriched with the new EM biopsy and microbiome and immune cell profile tests, which are described in this thesis. Unfortunately, no comparative data between previous practice and the new algorithm are presented. Studies in chronic endometritis hint at successful clinical outcomes. Thus, the results of this dissertation open new perspectives for research, which is a significant contribution. The Discussion is detailed and reinforces the importance of the results.

A rather lengthy **Discussion** of Results follows, further outlining the significance of the achievements.

After so much well-planned and executed work in this dissertation, I find the **Summary Conclusions** too general and declarative. They do not reflect enough clearly the true results of the doctoral thesis which it undoubtedly contains. I find that obtained results and concepts do deserve to be reflected in the conclusions of this PhD dissertation.

Some of them are formulated as contributions.

I agree with the formulated contributions as an original and confirmatory:

Original Contributions:

1. A method was developed to determine endometrial lymphocyte populations using flow cytometry from biopsies taken during the implantation window in the luteal phase in women with reproductive failure.
2. For the first time in Bulgaria, a comprehensive approach to studying endometrial biopsies was implemented, integrating molecular genetic and flow cytometric analyses.
3. For the first time in Bulgaria, the influence of endometrial microbiota on the local immune response was analyzed by comparing immune cell differences between groups of women with different microbiota compositions who had experienced RIF and RPL.
4. This study used a new method for the first time to group endometrial biopsies based on microbiota composition.
5. For the first time in Bulgaria, a study was conducted to evaluate the role of upper genital tract pathogens in chronic endometritis and endometrial dysbiosis in women with RIF and RPL.

Confirmatory Contributions:

1. The mean leukocyte percentages observed in the biopsies are consistent with data from previous studies demonstrating the validity of the sampling and processing procedure.
2. The increased incidence of dysbiosis and chronic endometritis in RPL and RIF is confirmed.
3. The influence of microbiota on reproductive outcomes is confirmed.
4. It is confirmed that endometrial microbiota dominated by *Lactobacillus* spp. is essential for optimal implantation.
5. The role of neutrophils in the endometrial immune response in cases with endometrial dysbiosis is confirmed.
6. The positive therapeutic effect of antibiotic therapy on chronic endometritis and reproductive outcomes is confirmed.

Some biographical Data about Svetla Blazheva, MD

Blazheva, MD graduated from Medical University – Pleven in 2008. Since then, she has worked as a physician in the Clinical Immunology Laboratory and, since 2016, as a consultant at the Medical Center – Clinical Institute for Reproductive Medicine, “St. Elisaveta”. In 2011, she became an assistant professor in the Department of Clinical Laboratory, Clinical Immunology, and Allergology at MU-Pleven. In 2016, she earned a specialty in Clinical Immunology. In 2024, she participated in the course "Tumor-Initiated Vaccine Therapy" in Tokyo, Japan.

She completed her doctoral training in Immunology from 2020 to 2024. Four scientific publications in English have been presented in connection with the dissertation work. These publications are cited in the Web of Science and Scopus. Additionally, ten presentations have been made at scientific forums, two of which were international and eight of which were Bulgarian.

According to the reference provided by NACID, Blazheva, MD meets the minimum requirements for a Ph.D degree.

In my preliminary **Statement** on the dissertation at the departmental council, I provided many comments and recommendations. Most of these comments and recommendations were taken into consideration and used in the final version of the dissertation.

In conclusion, the submitted dissertation meets the requirements of the Higher Education Act and MU Pleven's Regulations on the Growth of Academic Personnel. The theme is relevant and appropriate for a dissertation. The work explores the role of endometrial microbiota and immune cell content in women with reproductive issues. Considerable scientific and educational work has been carried out. Dr. Blazheva has successfully developed her skills as a physician and researcher in the fields of clinical immunology and reproductive medicine. Given these qualities of the work and the Ph.D student, I recommend that the Scientific Jury to award the Ph.D. to Svetla Ognyanova Blazheva, M.D.

14.05.2025

Sofia

Reviewer: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

/Prof. Iskra Petrova Altankova, MD, PhD, DSc/