

До Председателя на Научното жури-
доц. д-р Цветан Луканов,
определено със заповед 1222/30.04.2025 г.
на Ректора на МУ-Плевен
Проф. д-р Добромир Димитров, дм

СТ А Н О В И Щ Е

от проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дм, мзм
от Катедра Микробиология и Имунология на Медицински Университет – Пловдив,

за дисертационен труд за ОНС „доктор”

автор: д-р Светла Огнянова Блажева

форма на докторантура: самостоятелна подготовка (2020-2024 г.), в Катедра “Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология”, МУ – Плевен

докторска програма: „Имунология”

професионално направление 7.1. Медицина

област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

научни ръководители: доц. д-р Емилияна Конова, дм и доц. д-р Галя Ганчева-Бойчева, дм

тема: „Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при жени с репродуктивни неуспехи”.

Декларирам, че нямам общи публикации с докторантката.

Общо представяне на процедурата и докторанта

Д-р Блажева е представила в електронен вид комплект от материали за изготвяне на становище, съдържащ административни документи, дисертационен труд, автореферат и публикации. Документите съответстват на изискванията за процедурата за придобиване на ОНС ”доктор” в ЗРАС в РБългария и Правилника за приложението му в МУ-Плевен. Спазено е и изискването за назначаване на научното жури по заповед на Ректора на МУ-Плевен.

Кратки биографични данни на докторантката

Д-р Светла Блажева е родена през 1981 г. в гр. Стара Загора. Завършва висшето си образование през 2008 г. като магистър по медицина в МУ-Плевен. През 2016 г. придобива специалност по клинична имунология. Зачислена е в докторантура на самостоятелна подготовка през 2020 г. и е отчислена с право на защита през 2024 г. По време на кариерното си развитие д-р Блажева придобива редица практически, дигитални и организационни умения в областта на клиничната имунология - извършване на специализирани изследвания (FACS, ELISA, IIFA, CLIA), работа с ЛИС, софтуери за анализ на данни, координиране и управление на качеството на изследванията, консултации на пациенти с репродуктивни неуспехи, имунни дефицити, автоимунни нарушения,

онкологични състояния и алергии участие в изследователски проекти. Тя провежда практически занятия и лекции за студенти (на български и английски език) и на докторанти в областта на имунологията. Оценявам високо участието ѝ в обучителен курс на тема „Human Initiated Therapeutic Vaccine“ в Токио, Япония. Има участие и в два вътреуниверситетски проекта, свързани с темата на дисертацията.

Освен като асистент в МУ-Плевен, докторантката работи и като лекар със специалност по клинична имунология в Лаборатория по Клинична имунология към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД – Плевен и като имунолог в МЦ - КИРМ „Света Елисавета“ – Плевен.

Актуалност на тематиката

Избраната тема за дисертация е актуална поради факта, че неуспешните имплантации и ранните спонтанни аборти остават с висока честота въпреки напредъка на асистираните репродуктивни технологии. Предизвикателства за решение на проблема са свързани с необходимостта от по-задълбочено проучване на имунологичните и микробиомните характеристики на ендометриума, които участват в ендометриалната рецептивност. Иммунната дисфункция при повтарящите се имплантационни неуспехи и спонтанните загуби на бременност се очертават като важен фактор в описаните процеси. Интерес предизвиква разнообразният състав и балансът на ендометриалния микробиом, които налагат адекватна оценка на участието му в имплантацията. Липсата на системни проучвания в нашата страна по въпроса води до затруднения в получаването на достатъчно данни за механизмите на тези репродуктивни нарушения. Това мотивира докторантката и нейните научни ръководители да допълнят съществуващите данни в тази област и да анализира взаимодействието между ендометриалния имунен отговор и микробиома при жени с повтарящи се имплантационни неуспехи и загуби на бременност. Ето защо считам, че изборът за разработване проблем е актуален и наложителен.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертацията съдържа 183 страници и е структурирана в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел, Задачи, Материали и методи, Резултати, Дискусия, Обобщени изводи, Приноси, Литература, Приложения. Илюстрирана е с 15 таблици и 21 фигури. Библиографската справка включва 336 източника. Авторефератът отговаря на изискванията на ЗРАС в РБългария и Правилника за приложението му в МУ-Плевен. Структуриран е по стандартния начин и отразява най-съществените моменти от дисертационния труд в 60 стр.

Литературният преглед представя достъпно бременността като имунен парадокс, диференцията на трофобласта и имунните аспекти на имплантацията, коректно въвежда необходимите дефиниции, разглежда съвременните разбирания за ендометриалния микробиом, особеностите на женската репродуктивна имунна система с клетъчния състав и неговата динамика по време на менструален цикъл и бременност, вкл. ролята на НК клетките, фоликуларните Th (fTh) и други имунни клетки. Обзорът завършва с аналитично заключение, обосноваващо по-нататъшни задълбочени проучвания за имунните фактори и ендометриалната микробиота при жени с репродуктивни неуспехи с разработване на съвременни диагностични и терапевтични стратегии при тази група пациенти.

В тази връзка авторката формулира ясно поставена цел - *да се определят някои от характеристиките на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при*

жени с повтаряща се имплантационна недостатъчност (RIF) и повтарящи се загуби на плода (RPL) след АРТ процедури, за решаването на която си поставя добре планирани 8 задачи.

В подраздела “Материали и методи” е съобщен броят на включените в проучването 107 жени с RIF и 93 жени с RPL, постъпили за диагностично уточняване на инфертилитет и лечение чрез АРТ. Възрастта на пациентките варира от 26 до 41 г. Много добросъвестно са описани критериите за включване и изключване на жените, точното събиране и обработка на биологични проби с възможност за възпроизводимост, както и дизайнът на проучването, представен в прегледна фигура – вземане на вагинален и цервикален секрет за микробиологично изследване с оценка на дисбиозата, флоуцитометричен анализ от ендометриална биопсия и насочване за адекватна терапия. Използвани са рутинни методи за култивиране и идентификация на микроорганизми, а също и модерни генетични техники - мултиплексен PCR, за количествено определяне на микроорганизми в ендометриални биопсии. Флоуцитометричният анализ на ендометриални имунни клетки включва изследване на левкоцити, лимфоцити, макрофаги, неутрофили, uNK-клетки, прогениторни NK-клетки, Т-лимфоцити и плазматични клетки с подходяща комбинация от моноклонални антитела срещу специфичните клетъчни рецептори.

Прави впечатление и удачната комбинация от класически и съвременни микробиологични и имунологични методи, както и от информативни статистически и графични методи за анализ и представяне на получените данни.

Резултатите кореспондират на поставените задачи. Оценявам високо извършените изследвания върху ендометриалната микробиота. На базата на молекулярно-генетичното изследване на ендометриалните биопсии от жените с RIF и с RPL авторката класифицира групите пациентки по два основни начина: 1) според степента на нарушение на ендометриалната микробиота - в 4 подгрупи, и 2) според вида на микроорганизмите (микробния профил) – в 9 групи. При жените с RIF и RPL се установява значително нарушена микробиота с под 90% *Lactobacillus* spp. С най-голяма честота се доказва *Candida* spp. в повечето биопсии. Откриват се и интересни комбинации от аеробни, анаеробни микроорганизми и *Candida* spp. Представените данни убедително внушават, че нормалната ендометриална микробиота, характеризираща се с *Lactobacillus* spp., е важна за ефективната имплантация на бластоцистите, а дисбиозата на ендометриалната микробиота може да е част от патогенетичен механизъм в основата на RIF и RPL.

Друг акцент в резултатите са намерените значими разлики в процентните стойности на лимфоцитите, uNK-клетките и Т-клетките от ендометриалните имунни клетки между различните групи пациентки. В настоящото проучване са потвърдени данни, че при жените с RIF най-ниски средни стойности на uNK-клетки са установени в трета група ЕМ, където са наблюдавани най-високи средни процентни стойности на плазматичните клетки, както и че при възпаление на ендометриума се наблюдава увеличение на общия брой на левкоцитите. Окуражаващи са данните от корелационния анализ между различните типове ендометриални имунни клетки при жени с RIF, които откриват взаимовръзки между тези клетки, така че да се разбере по-добре тяхната роля в ендометриалната среда.

Показано е, че високите нива на левкоцити и лимфоцити в групата пациентки В с ниска биомаса в сравнение с групата с умерена дисбиоза са индикатор за възпаление, подчертавайки значението на лактобацилите за установяване на локална имунна хомеостаза. Липсата на лактобацили се свързва с повишено локално възпаление, както и до количествени

промени в ендометриалните имунни клетки, включително uNK-клетки, Т-лимфоцити и неутрофили.

Нов момент в дисертационния труд в сравнение с предишни проучвания, фокусирани предимно върху увеличението на В-лимфоцити, е доказването на по-широк панел от имунни клетки, участващи в патогенезата на ендометрита. Тези наблюдения в имунния профил могат да имат важни клинични последствия с повлияване на отговора на лечението и прогнозата на заболяването.

Флоуцитометричното изследване на ендометриалните имунни клетки преди и поне един месец след проведена антибиотична и пробиотична терапия на 46 проследени жени показва, че има статистически значима разлика в uNK-клетки преди и след лечението. Убедително е показано, че средният ранг на uNK-клетки след лечение е по-висок от средния ранг преди лечение, което предполага, че терапията е довело до значително увеличение на uNK-клетки при пациентите. Авторката посочва, че пробиотиците могат да модулират ендометриалната микробиота и да бъдат нова терапевтична стратегия в лечението на RIF и RPL.

Подчертан е ефектът на нарушенията на ендометриалната микробиота върху репродуктивния резултат чрез проследяване на пациентките по отношение на раждаемостта след завършване на антибиотичната и пробиотична терапия, насочена към лечение на ендометриалната дисбиоза. Данните за раждаемостта след първата, по отношение на проведената терапия, АРТ процедура (ICSI) са сравнени в различните групи пациентки според нарушението на ендометриалната микробиота. Доказано е, че жените с ендометриална биопсия, показваща нормална ЕМ, демонстрират статистически значимо по-високи нива на раждаемост в сравнение с останалите жени.

Изследванията са добра основа за представяне на алгоритъм за диагностично и терапевтично поведение при жени, планиращи АРТ. Считаю това за конкретен практически принос в дисертационния труд. Това са пионерски за страната ни проучвания.

На базата на получените резултати д-р Блажева предлага 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. За първи път в България с нейно водещо участие: 1) се прилага комплексен подход за изследване на ендометриални биопсии, комбиниращ молекулярно-генетичен и флоуцитометричен анализ; 2) 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; 3) е използван метод за групиране на ендометриални биопсии въз основа на състава на микробиотата; 4) 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.

Обсъждането на получените резултати е направено интелигентно и задълбочено.

Изводите са точни и съответстват на задачите и получените собствени данни.

Литературната справка е съвременна, адекватно цитирана и показва добрата осведоменост на авторката по проблема. Цитирани са общо 336 литературни източника, преобладаващо на английски и предимно от последните 10 години.

Приемам формулираните от д-р Блажева оригинални приноси на дисертационния труд, но не считам, че потвърдителните такива следва да се съобщават с приносен характер (няма потвърдителни приноси!)

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Свързани с дисертационния труд, авторката е публикувала 4 научни статии, от които 3 в български списания и 1 в чуждестранно. В 2 от тях тя е водещ автор, което недвусмислено подчертава личната ѝ роля и ангажираност в проведените проучвания. Броят на публикациите съответства на изискванията в Правилника на МУ-Плевен. Видно е, че е представила основните резултати от дисертацията си на 8 научни форума, от които 2 в чужбина.

Лично участие на докторанта

Потвърждавам добрите си лични впечатления от ангажираността на д-р Блажева в представянето на резултатите от дисертационния си труд на национални научни форуми.

Критични бележки и препоръки

Нямам забележки. Дисертационният труд и авторефератът са написани на точен, разбираем научен език. Препоръчвам максимално бързо да се оформи монография по темата.

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ, дисертационният труд на д-р Блажева напълно отговаря на ЗРАС в РБългария и на специфичните изисквания на Правилника за приложението му в МУ-Плевен. Планираните изследвания са извършени в достатъчен обем, а резултатите са добре онагледени, интерпретирани и визуализирани. Изводите са коректни, кореспондират на поставените задачи и получените резултати. Докторантката демонстрира умения за самостоятелна научна работа, придобила е значителни познания по изследвания проблем в областта на имунологията, микробиологията, репродуктивната медицина, а приносът ѝ за изясняване на имунните механизми и ролята на ендометриалния микробиом при репродуктивните успехи на жени е сериозен. Анализирайки цялостната документация, представена за оценка от Научното жури, считам, че д-р Блажева, заслужава придобиването на научната степен ОНС „доктор” по имунология. С оглед на това, като член на научното жури ще гласувам положително.

Минимални изисквани точки по групи показатели за ОНС „Доктор“

Група от показатели	Съдържание	Доктор (брой точки)	Точки на д-р С. Блажева
А	Показател 1	50	50
Б	Показател 2	-	
В	Показатели 3 или 4	-	
Г	Сума от показателите от 5 до 9	30	30,64
Д	Сума от показателите от 10 до 12	-	

Брой точки по показатели

Група от показатели	Показател	Минимален брой точки	Точки на д-р С. Блажева
А	Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"	50	80,64
	Заглавие: „Проучване на ендометриалния имунен профил и ендометриалната микробиота при жени с репродуктивни неуспехи“ – 50 т.		
	Г7: Публикации и доклади, публикувани в научни издания, <u>реферирани</u> и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (само Scopus и Web of science), 60/n:	30	
	1. Ivanov P., Lukanov T., Konova E., <u>Blazheva S.</u>, Rilcheva V., Tsvyatkovska T., Kovacheva K. <i>Activation of peripheral natural killer cells in women with repeated early pregnancy loss. Akusherstvo i ginekologia</i>, 2015, 54(8): 3-7; ISSN: 0324-0959; Web of Science, Scopus – 8,57 т. 2. <u>Blazheva S.</u>, Pachkova S., Bodurska T., Ivanov P., Blazhev A., Lukanov T., Konova E. <i>Unlocking the Uterine Code: Microbiota, Immune Cells, and Therapy for Recurrent Reproductive Failure. Microorganisms</i>, 2024, 12(3): Article number 547; e-ISSN: 2076-2607; Web of Science, Scopus – 8,57 т. Г8: Публикации и доклади, публикувани в нереферирани списания с научно рецензиране или публикувани в редактирани колективни томове, 30/n: 3. Pachkova S., Gincheva D., <u>Blazheva S.</u>, Konova E. <i>Frequency of urogenital mycoplasmas in women with reproductive problems. Akusherstvo i ginekologia</i>, 2019, 58(3): 18-22; ISSN: 0324-0959 – 7,5 т. 4. <u>Blazheva S.</u>, Bodurska T., Ivanov P.,		

Брой точки по показатели

Група от показатели	Показател	Минимален брой точки	Точки на д-р С. Блажева
	Pachkova S., Konova E. <i>Endometrial immune cells and endometrial microbiome in women with recurrent implantation failure</i> . Bulgarian Journal of Clinical Immunology, 2022, 15(1): 3-12; ISSN: 2738-7046 – 6 т.		
	Общо за Категория Г: 30,64 т.		

20.05.2025 год.

Изготвил становището: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД...**

Проф. д-р Мариана Мурджева, дм

**To the Chair of the Scientific Jury –
Assoc. Prof. Tzvetan Lukanov, MD, PhD
appointed by Order No. 1222/30.04.2025
of the Rector of the Medical University of Pleven
Prof. Dobromir Dimitrov, MD, PhD**

STATEMENT

by Prof. Marianna Atanasova Murdjeva, MD, PhD
from the Department of Microbiology and Immunology,
Medical University – Plovdiv,

regarding the dissertation thesis for the educational and scientific degree "Doctor"

Author: Svetla Ognyanova Blazheva, MD

PhD Program: Individual form of study (2020–2024),
Department of Clinical Laboratory, Clinical Immunology and Allergology,
Medical University – Pleven

Doctoral program: Immunology

Professional field: 7.1. Medicine

Higher education area: 7. Healthcare and Sports

Scientific supervisors: Assoc. Prof. Emiliana Konova, MD, PhD, and Assoc. Prof. Galya Gancheva-Boycheva, MD, PhD

Thesis title: *“Study of the Endometrial Immune Profile and Endometrial Microbiota in Women with Reproductive Failures”*

I declare that I have no joint publications with the doctoral candidate.

General Overview of the Procedure and the PhD student

Dr. Blazheva has submitted a complete set of electronic materials for the preparation of this opinion, including administrative documents, the dissertation manuscript, an abstract, and publications. The documents meet the requirements of the procedure for obtaining the educational and scientific degree “Doctor” under the Bulgarian Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the respective regulations of the Medical University – Pleven. The requirement for the appointment of the scientific jury by order of the Rector has also been fulfilled.

Brief Biographical Data of the PhD student
Svetla Blazheva, MD, was born in 1981 in Stara Zagora. She completed her higher education in 2008, earning a Master’s degree in Medicine from MU – Pleven. In 2016, she acquired a specialty in Clinical Immunology. She enrolled in an individual doctoral (PhD) program in 2020 and was discharged with the right to defend in 2024. Throughout her career, Dr. Blazheva, has developed various practical, digital, and organizational skills in the field of clinical immunology – performing specialized tests (FACS, ELISA, IIFA, CLIA), working

with laboratory information systems, data analysis software, coordinating and managing quality control, and consulting patients with reproductive failures, immunodeficiencies, autoimmune disorders, oncological conditions, and allergies, as well as participating in research projects. She conducts practical training and lectures for students (in both Bulgarian and English) and doctoral students in immunology. I highly value her participation in the educational course "Human Initiated Therapeutic Vaccine" in Tokyo, Japan. She has also contributed to two intra-university projects related to the topic of her dissertation. In addition to being a teaching assistant at MU-Pleven, the doctoral candidate also works as a clinical immunologist at the Laboratory of Clinical Immunology at "Dr. G. Stranski" University Hospital – Pleven and as an immunologist at the Medical Center - Clinical Institute for Reproductive Medicine "St. Elisaveta" – Pleven.

Relevance of the Topic

The focal point of this dissertation is particularly salient in the contemporary context, given the persistent prevalence of unsuccessful implantations and early miscarriages, despite the significant advancements in assisted reproductive technologies. Addressing this issue necessitates a more profound examination of the immunological and microbiome characteristics of the endometrium implicated in endometrial receptivity. Immune dysfunction has been identified as a significant factor in recurrent implantation failures and spontaneous pregnancy losses. The composition and balance of the endometrial microbiome are of particular interest, as they necessitate an adequate assessment of its involvement in implantation. The absence of systematic studies in our country on this issue engenders difficulties in obtaining sufficient data on the mechanisms of these reproductive disorders. This impetus prompted the PhD student and her supervisors to augment the extant data in this domain and to examine the interaction between the endometrial immune response and the microbiome in women experiencing recurrent implantation failures and pregnancy losses. Consequently, the problem selected for development is deemed both relevant and imperative.

Characteristics and Evaluation of the Dissertation Work

The PhD thesis is composed of 183 pages and is organized into the following sections: Introduction, Literature review, Purpose, Objectives, Materials and methods, Results, Discussion, Summary, Conclusions, Contributions, References, and Appendices. The text is supported by 15 tables and 21 figures. The bibliography comprises 336 sources. The abstract complies with the requirements of the Law in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application in MU-Pleven. It is structured in the standard way and reflects the most important points of the dissertation in 60 pages.

The literature review introduces the concept of pregnancy as an immune paradox, trophoblast differentiation, and the immune aspects of implantation. It correctly introduces the necessary definitions and discusses the current understanding of the endometrial microbiome. The review also discusses the features of the female reproductive immune system, including its cellular composition and dynamics during the menstrual cycle and pregnancy. It also includes the role of NK cells, follicular T helper cells, and other immune cells. The review concludes with an analytical conclusion that calls for further in-depth studies on immune factors and endometrial microbiota in women with reproductive failures. These studies would contribute

to the development of advanced diagnostic and therapeutic strategies for this patient population.

The author clearly states the objective: *to determine certain characteristics of the endometrial immune profile and microbiota in women with RIF and RPL following ART procedures*. She sets out 8 well-planned research tasks.

The Materials and Methods subsection reports the number of women enrolled in the study, 107 women with RIF and 93 women with RPL who presented for diagnostic clarification of infertility and treatment with ART. The age of the patients ranged from 26 to 41 years. The inclusion and exclusion criteria for women, the accurate collection and processing of biological samples with reproducibility, and the study design, presented in an overview figure, are very well described: collection of vaginal and cervical swabs for microbiological examination with assessment of dysbiosis, flow cytometric analysis of endometrial biopsies, and referral for adequate therapy. Routine methods for culture and identification of microorganisms were used, as well as modern genetic techniques - multiplex PCR, for quantification of microorganisms in endometrial biopsies. Flow cytometric analysis of endometrial immune cells includes examination of leukocytes, lymphocytes, macrophages, neutrophils, uNK cells, progenitor NK cells, T lymphocytes and plasma cells with an appropriate combination of monoclonal antibodies against specific cell receptors.

A successful combination of classical and modern microbiological and immunological methods, as well as informative statistical and graphical tools, is employed.

The results correspond to the set objectives. I highly appreciate the studies performed on endometrial microbiota. On the basis of the molecular genetic study of endometrial biopsies from women with RIF and with RPL, the author classified the groups of patients in two main ways: 1) according to the degree of endometrial microbiota disorder - into 4 subgroups, and 2) according to the type of microorganisms (microbial profile) - into 9 groups. Women with RIF and RPL were found to have significantly impaired microbiota with less than 90% *Lactobacillus* spp. *Candida* spp. were demonstrated with the highest frequency in most biopsies. Interesting combinations of aerobic, anaerobic microorganisms and *Candida* spp. were also detected. The data presented here strongly suggest that a normal endometrial microbiota characterized by *Lactobacillus* spp. is important for effective blastocyst implantation, and dysbiosis of the endometrial microbiota may be part of a pathogenetic mechanism underlying RIF and RPL.

Another highlight of the results was the significant differences found in the percentages of lymphocytes, uNK cells, and endometrial immune T cells between the different groups of patients. In the present study, data confirmed that in women with RIF, the lowest mean uNK cell values were found in the third EM group, where the highest mean plasma cell percentage values were observed, and that an increase in total leukocyte count was observed in endometrial inflammation. Encouraging are the data from the correlation analysis between different endometrial immune cell types in women with RIF, which reveal interrelationships between these cells so as to better understand their role in the endometrial environment.

High levels of leukocytes and lymphocytes in the group B with low biomass compared to the moderate dysbiosis group have been shown to be an indicator of inflammation, highlighting the importance of lactobacilli in establishing local immune homeostasis. Lack of lactobacilli was associated with increased local inflammation as well as to quantitative changes in endometrial immune cells including uNK cells, T lymphocytes and neutrophils.

A novel aspect of this dissertation compared to previous studies that focused primarily on B-lymphocyte increases is the demonstration of a broader panel of immune cells involved in the pathogenesis of endometritis. These observations in the immune profile may have important clinical implications in influencing treatment response and disease prognosis.

Flow cytometric study of endometrial immune cells before and at least one month after antibiotic and probiotic therapy of 46 followed women showed that there was a statistically significant difference in uNK cells before and after treatment. It was convincingly shown that the mean rank of uNK cells after treatment was higher than the mean rank before treatment, suggesting that the therapy resulted in a significant increase in uNK cells in the patients. The author suggests that probiotics may modulate the endometrial microbiota and may be a novel therapeutic strategy in the treatment of RIF and RPL.

The effect of endometrial microbiota disorders on reproductive outcome is highlighted by following patients in terms of fertility after completion of antibiotic and probiotic therapy aimed at treating endometrial dysbiosis. Fertility data after the first ART procedure (ICSI), in terms of the therapy performed, were compared in different groups of patients according to the endometrial microbiota disorder. It was shown that women with endometrial biopsy showing normal EM demonstrated statistically significantly higher fertility rates compared to other women.

Based on the results obtained, Dr. Blazheva, proposed a methodology for flow cytometric determination of endometrial lymphocyte populations by analysis of endometrial biopsies during the implantation window in the luteal phase in women with reproductive disorders. For the first time in Bulgaria with her leading participation: 1) a comprehensive approach to the study of endometrial biopsies was applied, combining RT-PCR method and flow cytometric analysis; 2) the influence of the endometrial microbiota on the local immune response was analyzed by differences in immune cells between groups with different microbiota composition in women with RIF and RPL; 3) a method was used to group endometrial biopsies based on microbiota composition; and 4) a study was performed to evaluate upper genital tract pathogens and their role in chronic endometritis and endometrial dysbiosis in women with RIF and RPL.

The discussion of the results is done intelligently and thoroughly.

The conclusions are accurate and consistent with the tasks and own data obtained.

The literature review is up-to-date, adequately cited and shows the author's good knowledge of the problem. A total of 336 references are cited, predominantly in English and mostly from the last 10 years.

I accept the original dissertation contributions formulated by Dr. Blazheva, but I do not believe that the confirmatory ones should be reported as contributions (there are no confirmatory contributions!).

Assessment of the publications on the thesis

Related to the dissertation, the author has published 4 scientific articles, of which 3 in Bulgarian journals and 1 in a foreign journal. In 2 of them she is the lead author, which unequivocally highlights her personal role and involvement in the conducted studies. The number of publications corresponds to the requirements in the Regulations of MU-Pleven. It is evident that she has presented the main results of her dissertation at 8 scientific forums, 2 of them abroad.

Personal remarks for the PhD student

I confirm my good personal impressions of Dr. Blazheva's involvement in presenting the results of her PhD work at national scientific forums.

Critical notes and recommendations

I have no critical comments. The thesis and the abstract are written in precise, understandable scientific language. I recommend to prepare a monograph on the topic as soon as possible.

In CONCLUSION, the PhD thesis of Dr. Blazheva, fully complies with the Law in Bulgaria and the specific requirements of the Regulations for its application in MU-Pleven. The planned research has been carried out in a sufficient volume and the results are well illustrated, interpreted and visualized. The conclusions are correct, correspond to the set tasks and obtained results. The PhD student has demonstrated skills for independent scientific work, has acquired considerable knowledge of the research problem in the field of immunology, microbiology, reproductive medicine, and her contribution to the elucidation of immune mechanisms and the role of the endometrial microbiome in the reproductive success of women is serious. Analyzing the overall documentation submitted for evaluation by the Scientific Jury, I believe that Dr. Blazheva, deserves the degree of PhD in Immunology. In view of this, as a member of the Scientific Jury, I will vote positively.

Minimum points required by indicator groups for the PhD

Group of Indicators	Content	Doctor (number of points)	Points of S. Blazheva, MD
A	Indicator 1	50	50
B	Indicator 2	-	-
C	Indicators 3 or 4	-	-
D	Sum of indicators from 5 to 9	30	30.64
E	Sum of indicators from 10 to 12	-	-

Number of Points by Indicators			
Group of Indicators	Indicator	Minimum Number of Points	Points of S. Blazheva, MD
A	Dissertation for awarding the educational and scientific degree "doctor"	50	80,64
	Title: " <i>Study of the endometrial immune profile and endometrial microbiota in women with reproductive failures</i> " – 50 pts.		
	G7: Publications and reports published in scientific journals, refereed and indexed in world-renowned databases with scientific information (only Scopus and Web of Science), 60/n:	30	
	1. Ivanov P., Lukanov T., Konova E., Blazheva S., Rilcheva V., Tsvyatkovska T., Kovacheva K. Activation of peripheral natural killer cells in women with repeated early pregnancy loss. <i>Akusherstvo i ginekologia</i>, 2015, 54(8): 3-7; ISSN: 0324-0959; Web of Science, Scopus – 8.57 pts. 2. Blazheva S., Pachkova S., Bodurska T., Ivanov P., Blazhev A., Lukanov T., Konova E. Unlocking the Uterine Code: Microbiota, Immune Cells, and Therapy for Recurrent Reproductive Failure. <i>Microorganisms</i>, 2024, 12(3): Article number 547; e-ISSN: 2076-2607; Web of Science, Scopus – 8.57 pts.		
	G8: Publications and reports published in non-refereed journals with scientific peer review or published in edited collective volumes, 30/n:		

	3. Pachkova S., Gincheva D., Blazheva S., Konova E. Frequency of urogenital mycoplasmas in women with reproductive problems. <i>Akusherstvo i ginekologia</i>, 2019, 58(3): 18-22; ISSN: 0324-0959 – 7.5 pts. 4. Blazheva S., Bodurska T., Ivanov P., Pachkova S., Konova E. Endometrial immune cells and endometrial microbiome in women with recurrent implantation failure. <i>Bulgarian Journal of Clinical Immunology</i>, 2022, 15(1): 3-12; ISSN: 2738-7046 – 6 pts. Total for Category G: 30.64 pts.		
--	--	--	--

Date: 20.05.2025

The statement was prepared by: На основание чл. 59 от ЗЗЛД
Prof. Marianna Murdjeva, MD, PhD