РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р Иванка Цачева,
Катедра Биохимия, БФ, СУ „Св. Климент Охридски“,
Член на научно жури, определено със заповед РД-38-260/27.05.2025 г.
на ректора на СУ „Св. Климент Охридски“

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Клетъчна биология“, на тема: „ЗНАЧЕНИЕ НА ЕНДОМЕТРИАЛНИЯ ИМУНЕН ПРОФИЛ ЗА УСПЕВАЕМОСТТА ОТ АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ“
Докторант: РУМЯНА РУМЕНОВА ГАНЕВА, Катедра „Клетъчна биология и биология на развитието“, Биологически Факултет, СУ “Св. Климент Охридски”.
Научен ръководител: доц. д-р Веселина Москова-Думанова, Биологически Факултет, СУ “Св. Климент Охридски”.,

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 5 от Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – ЗРАС и ППЗРАС и Препоръките на ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени.

Румяна Ганева е получила образованието си в Биологическия факултет на СУ “Св. Климент Охридски”. През 2016 г. се дипломира като бакалавър по Молекулярна биология, а през 2018 г. придобива магистърска степен в МП Биология на развитието. Придобила е допълнителни умения чрез онлайн курсове на Nature Masterclasses по Научно писане и публикуване; Експерименти: от идея до дизайн; Научно общуване и Научни презентации, както и Статистика в общественото здраве чрез онлайн курс на Университета Johns Hopkins.

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията за такъв тип научни разработки. Написан е на 193 А4 страници и съдържа следните основни раздели: 1. Увод (2 стр.); 2. Литературен обзор (59 стр.); 3. Цел и задачи (1 стр.); 4. Материали и методи (19 стр.); 5. Резултати и обсъждане (43 стр.); 6. Изводи (1 стр.); 7. Заключение (2 стр.) 8. Приноси (1 стр.). Приложена е информация, свързана с публикации и участия на докторантката на научни форуми, както и шест приложения, удостоверяващи становищата на Етичните комисии на Медицински център „Надежда“ и СУ „Св. Климент Охридски“, информираното

съгласие на пациентите, включени в изследването и сурови данни от ROC анализа. Много добро впечатление прави отличното техническо оформление на работата.

Актуалност на проблема. Периодите на бременност създават на пръв поглед парадоксалната ситуация в имунния статус на майчиният организъм, в който трябва да се поддържа толерантна среда към нововъзникналия плод и в същото време да се поддържа имунна защита срещу патогени, съществена част от която се реализира посредством клетъчни механизми. Контрол върху функциите на клетъчните участници в имунния отговор се постига със сложна мрежа от цитокинови стимули, синтезирани с участието на утеринните имунни клетки. Регулаторният ефект на локалния и системен цитокинов стимул през периода на имплантирането на ембриона е все още недоразбран, като акцент в тази тема е ролята на Т и В клетките, NK клетките и макрофагите. Търсят се подходящи клетъчни и молекулни маркери, чрез които да се установят параметрите на имунен статус, който осигурява от една страна успешна имплантация, а от друга успешен завършек на бременността. В този смисъл дисертационният труд на Румяна Ганева е особено ценна, като се има предвид конкретното клинично приложение на едно такова знание при асистираната репродукция.

Литературният обзор последователно представя ролята на ендометриума в процесите на репродукция, ролята на имунната система в процесите на имплантация, маркери за разпознаване на имунни клетки в ендометриума, роля на имунните клетки в репродуктивни патологии, методи за диагностика на имуноопосредстван RIF (повтарящ се имплантационен неуспех) и имунотерапия при in vitro пациенти. Направеният преглед на литературата е изчерпателен, информативен и логически свързан. Всеки вид имунни клетки е характеризиран функционално в системния имунен отговор и в частност в ендометриума. Румяна се е справила със сложната задача да представи имунните клетки като мрежа от източници на молекулни стимули, характеризиращи динамичната среда в матката преди и след имплантация. В изложението се откриват някои фактологични грешки и двусмислени означения (Tk вместо Tc; крайна матурация вместо крайна диференциация; комуникация вместо взаимодействие; CD3 ко-рецептор вместо сигнална субединица; моноцити, представени като лимфоидни вместо миелоидни клетки и др.). Въпреки тези пропуски литературният обзор създава добро впечатление за нивото на подготовка на Румяна за реална експериментална работа в тази сложна тема.

Препоръката ми към този раздел е да се избягва използването на чуждици (резултира, матурира, имунен толеранс, предикция).

Поставената цел е да се установят имунни индикатори за ендометриална рецептивност, които да дават оценка на ефективността на проведена локална имунотерапия при in vitro пациенти с RIF.
За съставяне на експерименталния дизайн и подготовка на изследванията е извършен изчерпателен анализ на научната литература по темата, цитирани са 344 източника.

Експериментален замисъл (задачи)
Изследователската работа е разделена на две части, които са взаимно свързани. Първоначално в група от 116 жени са анализирани количествено и качествено имунните популации, които присъстват в ендометриалната строма по време на средна лутеална фаза. Следва сравнителен анализ на имунните популации в ендометриалната строма при пациенти с успешна и неуспешна ембрионална имплантация за извеждане на имунни индикатори за ендометриална рецептивност като съотношения между различни двойки имунни клетки.
Във втората част целта е на базата на изведените имунни индикатори да се определи ефекта на приложено третиране с PBMC за успеваемостта при ембриотрансфер, за ендометриална рецептивност, в т.ч. и сравнително определяне на ефекта от третирането за рецептивност преди и след поставяне на PBMC според резултата от ембриотрансфер.

Резултати
При първата част от експерименталната работа в биопсични проби от цялата изследвана група от 116 пациенти чрез имунохистохимичен анализ са определени процентното разпределение на имунни клетки и корелациите между тях, като е установено, че всички изследвани имунни клетки в ендометриалната строма корелират значително. Най-високият корелационен коефициент се установява между макрофаги и Т лимфоцити ($R=0.563$, $p<0.001$), NK клетки и моноцити ($R=0.588$, $p<0.001$) и NK и В клетки. Определени са количествата имунни клетки по отношение на резултата след ембриотрансфер в двете групи – с успешна имплантация и с неуспешна имплантация, както и корелациите между тях. Изчислени са съотношения на различни двойки имунни клетки, които са подложени допълнително и на ROC анализ, чрез който са подбрани 6 имунни индикатора за оценка на ендометриалната рецептивност - съотношенията NK/T

(CD 56/CD3), Tc/T (CD8/CD3), Th/T (CD4/CD3), МФ/T (CD68/CD3), Th/Tc (CD4/CD8) и Th/МФ (CD4/CD68), показали висока дискриминативна стойност.

Във втората част от работата са включени 18 пациенти с повтарящи се имплантационни неуспехи. В техни плазмени проби не са открити разлики в концентрациите на IL-6, TNF-α, IL-4 и IL-10 при сравнение с концентрациите на същите цитокини в контролна група здрави жени. От всяка от пациентките се изолират мононуклеарни клетки от периферна кръв (автоложни PBMC) и видът и количеството на изолираните лимфоцити от периферната кръв е определен флоуцитометрично. Проведен е предварителен експеримент по избор на метод за култивиране на изолираните PBMC с hCG, при който на базата на оценка на преживяемостта на култивираните клетки и на концентрациите на секретираните в средата основни провъзпалителни (TNF-α и IL-6) и противовъзпалителни (IL-4 и IL-10) цитокини за 24 часа инкубиране се установява, че хормонът не е критично необходим.

Чрез измерване на количеството на провъзпалителния опсонин на острата фаза CRP в кръвната плазма е установено, че интраутеринното поставяне на автоложни PBMC не води до проява на системно възпаление. Също така се установява, че след поставяне на PBMC, количеството на CD4+ Т клетките се повишава значително, което се оценява като положителен ефект за успешна имплантация.

Определена е успеваемостта на ембриотрансфер след интраутеринно поставяне на автоложни PBMC, като от включените 18 пациенти 11 преминават през ембриотрансфер 1 месец след третирането и при 36.4% (4/11) от пациентите е установена успешна ембрионална имплантация.

Направен е сравнителен анализ на имунните показатели след поставяне на автоложни PBMC при пациентите с успешна и неуспешна имплантация. При жени с успешен ембриотрансфер след интраутеринно поставяне на автоложни PBMC съотношението МФ/Т показва близко до значимост (p=0.068) увеличение, което може да се дължи на понижаване на общите Т лимфоцити и повишаване на макрофагите.

Сравнително са анализирани имунните показатели преди поставяне на PBMC при пациентите с успешна и неуспешна имплантация**,** за да се разграничат тези, при които третирането би променило ендометриалната среда в желаната посока, което да доведе до успешна имплантация. В изследваните имунни показатели не се откриват значителни различия между групата с успешна и неуспешна имплантация според тези ендометриални имунни показатели. Като се има предвид, че извадката не е голяма, най-

вероятно тези резултати трябва да бъдат валидизирани в група, включваща по-голям брой пациенти.

Съотношенията МФ/Т, NK/T, Th/T и Th/Tc показват висок положителен предсказващ потенциал, тъй като повечето от успешните случаи са със стойности на тези съотношения над определените в етап 1 гранични стойности. Също така се наблюдава висок отрицателен предсказващ потенциал на МФ/Т, Th/Tc и Tc/T, тъй като повечето от неуспешните случаи са със стойности на тези съотношения под определените в етап 1 гранични стойности.

Отлично впечатление прави анализът на резултатите от дисертационния труд в дискусия от две части, където те са обсъдени и в контекста на вече публикувани факти от други автори. Тази дискусия затвърждава убеждението ми за актуалността на тематиката и изключителната трудност по анализирането на толкова големи по обем данни. Особено високо оценявам създадените схеми за сравнително представяне на ендометриалната имунна среда при успешна и неуспешна имплантация. Подобен тип онагледяване представя по адекватен начин разбирането на дисертантката, до което е достигнала в хода на работата.

Работата по настоящия дисертационен труд има научно-теоретични и научно-приложни приноси. Особена тежест и висока оценка на дисертационния труд придават приносните резултати, постигнати за първи път в България.

Изводи

На базата на проведените експерименти са формулирани 6 извода – три от резултатите от първата част и още 3 от резултатите от втората част. Изводите са коректно формулирани и напълно кореспондират с постигнатите резултати.

Наукометрия

Резултатите във връзка с дисертацията са публикувани в 3 статии, две от които са в утвърдени, реномирани списания с импакт фактор и Q1. Те вече са цитирани поне 7 пъти. Дисертантката е участвала с доклади в 4 международни форума и с постери в 14 форума.

Авторефератът съдържа 58 страници и отразява достоверно най-съществените резултати, получени при разработката на дисертационния труд. Структуриран е много добре, съдържа обобщени данни и научна интерпретация на получените резултати.

Изводите и приносите са непроменени. Считам, че авторефератът отговаря на всички необходими изисквания.

Въпроси

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Как си обяснявате липсата на корелация между $CD56^+$ NK и $CD3^+$ Т клетки (фиг.4.5) при групата с успешна имплантация, като в същото време съотношението NK/T е със статистически значима висока стойност (таблици 4.3 и 4.4) и е един от избраните индикатори?
2. Защо е възможно при едни пациенти с RIF да има значение броя на CD3+ Т клетките за успешна имплантация, а при други да няма значение, както е написано в дискусия 1 част?

Заключение

Представеният дисертационен труд по обем, форма и съдържание изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и Правилника на СУ „Климент Охридски". Той е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация. Темата е актуална, изследванията са проведени методично правилно, усвоен е широк набор от съвременни методи, извършена е сериозна по обем и мащаб изследователска дейност, показано е умение за тълкуване на получените резултати и извеждане на изводи и приноси. Дисертационният труд е оригинален, с научни и приложни приноси и е дело на автора.

Изложеното по-горе ми дава основание да считам, че дисертационния труд е на високо научно ниво, придобити са компетенции в съответствие с изискванията и убедено ще гласувам за присъждане на образователната и научна степен „доктор" на РУМЯНА РУМЕНОВА ГАНЕВА.

04.07.2025 Подпис:

София доц. д-р Иванка Цачева