До Председателя на Научно жури
Определено със заповед РД-38-260/27.05.25г
На Ректора на Софийски Университет
“Св. Климент Охридски”

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р Таня Димова, Институт по биология и имунология на размножаването, Българска академия на науките

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”
Професионално направление 4.3. Биологични науки
Научна специалност Клетъчна биология
Автор: Румяна Руменова Ганева
Форма на докторантурата: Задочна
Научна организация: Софийски Университет, Биологически факултет
Тема: **Значение на ендометриалния имунен профил за успеваемостта от асистирана репродукция**
Научен ръководител: доц. д-р Веселина Москова-Думанова

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект документи във връзка със защитата на дисертационния труд е в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и неговия Правилник за придобиване на ОНС “Доктор” , както и на специфичните изисквания на Правилника на Софийски Университет “Св. Климент Охридски”. Комплектът съдържа дисертация и автореферат, автобиография, дипломи за бакалавърска и магистърска степени, заповед за зачисляване на докторанта, удостоверение за взети изпити, заявления от докторанта и научния ръководител за разкриване на процедура по защита на дисертацията, декларация за оригиналност на дисертационния труд с две приложения, авторска справка за научната активност, справка за съответствие с минималните национални изисквания за ОНС „доктор“ за област 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки.

2. Кратки биографични данни

Румяна Ганева е биолог към научно-изследователската лаборатория, МБАЛ “Надежда” от 2016г. до момента. През 2016 г завършва висшето си образование, бакалавърска степен по Молекулярна биология в Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, а през 2018г. става Магистър по “Биология на развитието” в същия факултет. През 2022 г. със заповед РД-20-84/18.01.22г на Ректора на

СУ, Румяна Ганева е зачислена като редовен докторант в специалност “Клетъчна биология”, в Катедрата по Цитология, хистология и ембриология”, Биологически факултет на СУ със срок на обучение 3 години, считано от 01.02.2022г до 01.02.2025г и научен ръководител доц. д-р Веселина Светославова Москова-Думанова. През февруари 2022, с решение на Факултетния съвет на Биологически факултет докторантурата е преобразувана в задочна със срок на завършване февруари 2026г. Преди срока за отчисляване Румяна Ганева успява да положи успешно всички изпити, да изпълни задачите в индивидуалния си план и да подготви дисертационния си труд, в резултат на което през март 2025г стартира процедура по защита на дисертационния труд. В допълнение към задължителната й подготовка като докторант през 2023 и 2025г. Румяна Ганева провежда онлайн обучение по “Статистика в Общественото здраве” към John Hopkins University и няколко Nature Masterclasses онлайн курсове като “Научни презентации”, “Комуникация на научни резултати”, “Експерименти: от идея до дизайн” и “Научно писане и публикуване”. Авторската справка за научната активност на кандидата показва съавторство в 15 научни статии на докторантката, 14 от които в реферирани научни списания и една в годишника на СУ. От реферираните научни статии 6 са в Q1, а 8 са в Q2.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Дисертационният труд на Румяна Ганева е задълбочена разработка в изключително актуална научна област с подчертано клинично значение и социален импакт, а именно човешката репродукция и по-специално нейната неефективност при пациентки с повтарящи се имплантационни неуспехи. За съжаление, човешката репродукция (както естествена, така и асистирана) е неефективен процес, тъй като едва едно от всеки три оплождания се реализират в успешна бременност. При останалите ембрионът се губи в периода около и по време на имплантацията в матката или в периода на ранна бременност като 10% от загубите са в резултат на имунологичен дисбаланс. Успешната имплантация и бременност изисква строго регулиран баланс между имунна толерантност спрямо различния геном на имплантиращия се ембрион и имунна активация в случай на трансплацентарна инфекция и неконтролируема трофобластна инвазия. Въпреки че асистираната репродукция добави нови възможности за изучаване на човешката репродукция, а именно морфологична и генетична оценка на ембриона, проследимост на трансфера му в матката и настъпването на имплантация, клиницистите наблюдават нарастващ брой случаи с повтарящи се имплантационни неуспехи или т.нар. RIF синдром след IVF-ET, които до 2024-та година са близо 20% от ин витро пациентите. RIF е все още слабо проучен синдром на безплодие при иначе здрави жени и се смята, че 50% от тези случаи имат имунологична етиология, а при 82% от тези жени се открива абнормална ендометриална имунна регулация.

Ембрионът при асистираната репродукция може да бъде преценен морфологично и генетично преди трансфера в матката, но той е само едната страна в сложния процес на имплантация. В последните години се наблюдава значителен интерес към ролята на ендометриума и пери-имплантационната среда върху последващото развитие на ембриона. Натрупват се все повече доказателства, че майчините имунни клетки локално в мястото на

имплантация активно допринасят за ендометриалната рецептивност и имплантацията на ембриона. Вътрематочното приложение на активирани автоложни периферни мононуклеарни клетки ефективно подобрява резултатите от IVF при пациенти с RIF. Всички тези факти показват, че в контекста на настоящото състояние на познанията, човешката имплантация все още е неясен процес и реална бариера пред техниките за асистирана репродукция, въведени преди много години от Edwards и Steptoe и следователно възможността за клинична интервенция е все още ограничена. Настоящата дисертация има за цел да попълни липсващи знания относно характеристиката на ендометриалния имунен профил при жени с RIF и да идентифицира ключови имунни промени с роля на потенциални биомаркери за прогнозиране на имплантационен (не)успех, както и за ефективността от проведена имунотерапия.

4. Познаване на проблема

Докторантката познава отлично състоянието на проблема не само теоретично и експериментално, подготвяйки дисертационния си труд, но и работейки активно в научно-изследователската лаборатория на болница "Надежда" където ежедневно се сблъсква с жени с RIF. Анализирайки критично публикуваните данни от други автори, работещи по темата тя успява да открие лимитите на предишни проучвания и нишата, в която да разгърне научноизследователския си потенциал. Целта и задачите й са адекватно поставени, целесъобразното е планирала проучванията си като е подбрала подходящи изследователски методи.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд на Р. Ганева е представен на 193 страници със следните раздели: Литературен обзор – 58 стр., Цел и задачи – 1 стр, Материали и методи – 19 стр., Резултати и дискусия – 41 стр., Изводи – 1 стр, Заключение – 2 стр. Приноси – 1 стр, Библиография – 18 стр. Приложения – 6 бр., Използвани съкращения – 5 стр. Дисертационният труд има 40 фигури и 19 таблици. Богатата библиографията включва 343 литературни източника, от които 37% са публикувани през последните десет години, което още веднъж подчертава актуалността на тематиката.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е доста всеобхватен и в същото време в него целенасочено се анализира проблема за ролята на ендометриума в имплантацията на ембриона в биологичен и имунологичен аспекти. Докторантката е направила обща характеристика на основните типове имунни клетки и важните имунни популации локално в децидуата с акцент върху ролята им, както в успешната имплантация, така и в редица репродуктивни патологии вкл. RIF. Авторката насочва вниманието на читателя към методите за диагностика на имуномедииран RIF при *ин витро* пациенти и систематизира последните проучвания в прилагането на имунотерапии за това страдание. Така естествено се адресира критична липса на знания в модерната репродуктивна медицина относно причините за повтарящите се имплантационни неуспехи като се акцентира върху противоречивите научни данни вкл. и относно ефективността на различни имунорегулаторни лечения. За

съжаление, както подчертава докторантката, няма валидирани, лесно достъпни диагностични тестове за потвърждаване на имуномедиирани повтарящи се имплантационни неуспехи и имунните терапии често са емпирични без солидни доказателства за тяхната ефикасност. Липсата на чисто теоретични знания, които да бъдат използвани в клиничната практика пречи за въвеждане и утвърждаване на имунни интервенции, основани на доказателства. Всичко това мотивира изследванията в този дисертационен труд, а именно анализа и идентификацията на имунни маркери за ендометриална рецептивност, които да позволят персонализиран подход в лечението на RIF и да подобрят резултатите от *ин витро* процедурите. Литературният обзор е обилно онагледен с 11 фигури-схеми. В някои от фигурите например за онагледяване на менструалния цикъл авторката е поставила собствени хистологични снимки, което също е добра практика. В литературния обзор са включени и 4 таблици. Адмирирам представянето на информация схематично и в табличен вид, защото улеснява читателя. Целта на дисертационният труд е ясна и конкретна, а именно **да се установят имунни индикатори за ендометриална рецептивност, които да позволят оценка на ефективността на проведена локална имунотерапия при *ин витро* пациенти с RIF**. Поставени са 8 задачи за постигане на целта като всички те са целесъобразни и логически свързани.

В Раздел МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ докторантката представя дизайна на проучването, което е в два етапа. Материалите и методите са описани подробно и разбираемо за всеки етап поотделно като са систематизирани на инфографики. В етап 1 участват 116 жени-пациентки с RIF, които са прецизно подбрани да отговарят на 14 критерия. Това показва, че докторантката е осъзнала необходимостта от правилното дефиниране и окомплектоване на експерименталните групи като елемент от изключителна важност за успеха на всяко проучване. В етап 1 са сравнени имунни показатели в ендометриума на пациенти с RIF, подложени на ембриотрансфер в контекста на изхода от имплантацията - успешна или неуспешна. След задълбочен статистически анализ са подбрани имунни показатели, които разграничават случаите с успешна и неуспешна имплантация. В етап 2 селектираните ендометриални имунни показатели са проследени при жени с RIF, на които е приложена имунотерапия – интраутеринна апликация на автоложни PBMC. В етап 2 участват 18 жени-пациентки с RIF, които са подбрани така че да отговарят на 11 критерии. Автоложните PBMC са фенотипизирани срещу контролна група от жени-доброволци, с предишни раждания с естествено зачеване (техният брой не е уточнен). При тези две групи са сравнени някои маркери за системно възпаление и цитокини с оглед безопасност на апликацията. Описани са подробно хормоналната стимулация на жените, датирането и обработката на ендометриалните биопсии за получаване на трайни хистологични срези, хистологичният анализ и софтуерно-базираната имунохистохимична цитометрия с помощта на HALO Image Analysis Software, ELISA метод за измерване на цитокини, получаване, култивиране и фенотипизиране на PBMC с FACS, както и апликация им. Всички използвани антитела са дадени в таблица с каталожен номер, фирма производител и разреждане. Подобна информация е осигурена за всички използвани реагенти и китове. Основни методи за анализ в тези проучвания са статистическите, на

базата на които се селектират имунните параметри и се преценява предиктивната им сила като маркери за ендометриална рецептивност. Докторантката показва умения в статистическата обработка на данните, прилагайки разнообразни, но адекватно подбрани статистически методи за да провери хипотезите си. Използвани са статистическите пакети SPSS и GraphPad Prism като начина на представянето на данните (средна стойност със стандартно отклонение или медиана с диапазон) и използваните тестове за сравнение (параметрични или непараметрични) са съобразени с модела на разпределение на данните – нормално Гаусово или изкривено "skewed distribution". Проследена е корелацията между отделните имунни показатели, а прогностичната им стойност за оценка на ендометриалната рецептивност и ефективността на клетъчното лечение е преценена чрез ROC анализ. Този тип анализ предлага прогностична стойност, базирана на компромиса между чувствителност и специфичност при различни прагови настройки и се използва за оценка на медицински диагностични тестове. Имайки предвид, че нито един медицински тест не е перфектен, докторантката е обяснила подробно интерпретацията на данните от този анализ. Описани са подробно и специализираните манипулации като част от *ин витро* процедурите, съпътстващи проучванията в дисертационния труд и извършени от медицинските екипи, съобразно добрите клинични практики, прилагани в МЦ. Тази допълнителна информация обогатява значително дисертационния труд. Описани са надлежно и са приложени всички документи, които се изискват при научноизследователска работа с човешки образци като разрешения от етичната комисия на медицински център Надежда и от етичната комисия на СУ и информирано съгласие за донорство на пробите. Също така е приложен документ за регистрирано клинично проучване за проведеното клетъчно лечение на жените-пациентки с RIF. За изследванията в дисертацията са обработени впечатляващо количество ендометриални проби общо 131, събирани в периода 2020-2024 г. Изследванията са проведени в МБАЛ "Надежда".

Раздел РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ**:**

Резултатите са описани стегнато и в съответствие с поставените задачи. Разделени са в две групи според двата етапа на проучването, като непосредствено след резултатите за дадения етап следва дискусията им. Стилът на изложение е строго научен и в същото време информацията е лесна за възприемане, благодарение и на изработените 14 фигури и 12 таблици. В етап 1 от проведеното изследване са анализирани количествата и съотношенията на имунните клетки в ендометриум на жени с RIF, които са преминали през *ин витро* процедура и имат резултат след ембриотрансфер т.е. дали имплантацията е успешна или неуспешна. По този начин са използвани възможностите, които дава асистираната репродукция, а именно фрагментиране на репродуктивния процес, датиране и проследимост на отделните му етапи, в случая чрез ембриотрансфера могат да се проследят жени с RIF с успешна и неуспешна имплантация. Базовите характеристики на изследваните жени-пациентки в етапа са представени таблично по групи – с успешна и неуспешна имплантация след ембриотрансфер в сравнителен аспект. Те включват години, индекс на телесна маса, вид инфертилитет, предишни неуспешни опити, брой ембриони с добро качество, брой

трансферирани ембриони, серумен прогестерон и естроген в деня на трансфера. Използвана е софтуерно-базираната имунохистохимична цитометрия за *in situ* фенотипизиране на имунните популации в ендометриума, което е нов и интересен подход. В повечето случаи имунофенотипизирането се прави с флоуцитометричен анализ. Той е доста прецизен метод, но трудно приложим при биопсични материали, но по-важното е, че не може да даде представа за локализацията и клъстерирането на имунните клетки, което може да бъде показано единствено с имунохистохимична визуализация. Визуализирани са и са сравнени количествата на седем имунни популации – Т лимфоцити, В лимфоцити, хелперни Т клетки, цитотоксични Т клетки, моноцити, макрофаги и NK клетки. Приложени са микроскопски снимки на информативни хистологични срези с отлично качество като са показани конвенционално оцветени и имунохистохимично маркирани срези с необходимите негативни и позитивни контроли. Позитивната контрола за специфичност на имунооцветяването е направена на препарати от далак. Количеството на позитивните за даден маркер имунни клетки е представено като брой позитивни клетки от общия брой стромални клетки. След статистическа обработка са представени като медиана и диапазон. Подобен подход предполага ниски стойности поради относително малкия дял позитивни клетки към общия дял стромални клетки и в този ред на мисли оперирането с ниски стойности изисква прецизност в обработката на данните, каквато докторантката се е постарала да приложи. Резултатите потвърждават, че имунната компонента в ендометриума е важна за ембрионалната имплантация/плацентация. Получени са интересни данни за сигнификантното *in situ* преобладаване на Т клетките в лутеален ендометриум при жени с RIF с неуспешна имплантация след ембриотрансфер. Останалите ендометриални имунни клетки не показват значими разлики при двете групи жени и докторантката сполучливо се е насочила да провери как съотношенията между тях корелират с успеха на имплантацията. Открива, че неуспешната имплантация се свързва с достоверно по-ниски съотношения Tk/T, Th/T, МФ/T, и по-високи NK/Mon и T/Mon съотношения. Именно тези имунни съотношения плюс още няколко, които са на границата на значимост (NK/T, Th/Tk, Th/МФ) заедно с количествата на тоталните Т клетки и на моноцитите са избрани да бъдат преценени като прогностични маркери за ембрионалната имплантация чрез подлагането им на ROC анализ. Докторантката установява **висока дискриминативна стойност на съотношенията NK/T, Tk/T, Th/T, МФ/T, Th/Tk и Th/МФ за преценка за успеваемостта след ембриотрансфер**. Например, съотношението МФ/T се оказва важен индикатор за подобряване на ендометриалната рецептивност, с гранична стойност с изключително висока прецизност от 66.36%. Систематизиран е и възможен механизъм на взаимодействие между имунните клетки в ендометриума по време на имплантационния прозорец в случаите с успешна или неуспешна имплантация. Проверена е възможността тези имунни индикатори да се използват както за оценка на ендометриалната рецептивност, така и за успешната имплантация след приложена имунотерапия на жени с RIF. При сравнителното фенотипизиране на автоложни PBMC, подготвени за интраутеринна апликация от жени с RIF и от здрави жени авторката установява, че няма разлика в пропорциите на основните имунни клетки. Получено е обаче малко необичайно съотношение CD4/CD8 в кръвта 1.44

за двете групи, докато общоприетото е 2, особено при здрави донори. Установено е, че след поставяне на PBMC и проведен ембриотрансфер средната успеваемост при пациентките с RIF в това проучване е 36.4% (4/11, Фигура 6.5) и е сходна с тази на пациентки с RIF изобщо според CDC (The Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2021) т.е. не е установен промотиращ ефект на клетъчното лечение. От друга страна обаче тази успеваемост е по-висока от средната успеваемост след първи опит за *ин витро* оплождане при жени между 35-40 годишна възраст (с каквато извадка работи и докторантката), която е 26% (CDC, 2021). Въпреки, че автоложното третиране с PBMC води до подобрение на ендометриалната имунна среда преди ембриотрансфер, тя доказва, че избраните имунни индикатори за ендометриална рецептивност не могат да прогнозират кои пациентки с RIF ще имат положителен ефект от клетъчното лечение и че наличието на RIF не е достатъчна причина да се приложи клетъчно лечение.

Дискусията е написана увлекателно и показва сериозната и задълбочена информираност на докторантката. Тя умело дискутира собствените си данни върху имунния профил на рецептивен ендометриум, асоцииран с успешна имплантация на фона на данни от други автори като визуализира разсъжденията си с графични абстракти. Това което ми направи отлично впечатление е, че докторантката умело синтезира резултатите си и добавяйки елемент на дискусия изготвя информативни графични абстракти. В тях са представени научните находки за имунните профили в комбинация с хипотетични модели за механизми на взаимодействие между имунните клетки. Също така е описан хипотетичен механизъм на имунни взаимодействия след третиране с автоложни PBMC. Трябва да подчертая, че болшинството от схемите на фигурите в дисертационния труд като цяло са изработени от самата докторантка с илюстратора Biorender, а не са заимствани. Дефинирани са и някои от лимитите на настоящето проучване. За мен много добро впечатление прави когато докторантът осъзнава ограниченията на собственото си изследване и не се страхува да ги посочи, това е доказателство за неговата научна зрялост и заявка за преодоляване на тези лимити в бъдеще. Във всяко проучване, колкото и всеобхватно да е то, има непроучени неща, важното е изследователят да ги осъзнава.

На базата на получените резултати са изведени 6 извода. Приемам формулираните от докторантката ИЗВОДИ с някои съвсем малки забележки. Според мен изводите изкуствено са разделени на изводи от етап 1 и изводи от етап 2. Извод 1 е потвърдителен, но е леко спекулативен без данни от здрави контроли в настоящето проучване.

6. Принос и значимост на разработката за науката и практиката

Данните за имунните съотношения-индикатори за ендометриална рецептивност, установени в дисертационния труд могат да се използват и в клиничната практика за оценка на ендометриалната рецептивност на *ин витро* пациентки с RIF. По този начин, както предлага и самата авторка, след като бъде установена ниска рецептивност и имунен дисбаланс може да се предприемат мерки по третиране на това състояние вместо да се правят нови неуспешни *ин витро* процедури, което се отразява неблагоприятно на пациентките и в емоционален, и във финансов план. За първи път в България са изведени

индикатори за изследване на ефектите от приложението на системни или локални имунни терапии върху ендометриалния имунен профил и ендометриална рецептивност при *ин витро* пациентки с RIF. Изследван е ефектът на едно от най-често използваните имунологични лечения при *ин витро* пациенти – интраутеринно поставяне на автоложни PBMC – както върху ендометриалния имунен профил, така и върху успеваемостта на пациентки с RIF.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

По дисертацията има публикувани 3 статии, една в Q1 и една в Q2, с общ импакт фактор 5.6, третата статия е публикувана в Годишника на СУ. В две от публикациите докторантката е първи автор, в 3-та – втори. Тези публикации са отлична атестация за важността на темата, качеството на дисертационния труд и отличното научно ръководство. Посочени са 18 участия в научни форуми с докладвания на резултати от дисертацията под формата на устни доклади – 4, останалите под формата на постери.

8. Лично участие на докторантката, оригиналност и автентичност на дисертационния труд

Дисертационният труд е лично дело на докторантката, данните са оригинални и автентични, показано от направената справка за плагиаризъм и доклада на научния ръководител.

9. Автореферат

Считам, че по своето съдържание и структура авторефератът напълно отговаря на изискванията и отразява изчерпателно и точно съдържанието на дисертацията. Написан е на 58 стр.

10. Критични забележки и препоръки

Имам няколко забележки по обзора, някои от които са чисто технически или стилистични, други са неправилно преведени термини. Принципно CD8 T клетките се дефинират по-скоро като цитотоксични, а не като клетки убийци, както са описани в дисертацията, въпреки че по същество са такива. На стр. 17 “се продуцира водниста мукоза”, трябва да бъде мукус защото мукоза означава лигавица; “водещият фоликул освобождава яйцеклетка”, правилно е, че освобождава ооцит. На стр. 18 “прогестеронът подготвя жълтото тяло и ендометриума”, трябва да бъде прогестеронът се отделя от жълтото тяло и подготвя ендометриума; “ако настъпи бременност, оплодената яйцеклетка се имплантира в ендометриума”, правилно е да се каже, че ако настъпи опложданe, зародишът в стадий бластоцист се имплантира в ендометриума. На стр. 20 “ембрионът се плъзга по лумена на ендометриума” - луменът е на матката, не на ендометриума, а ембрионът по-скоро бива придвижван по апикалната повърхност на епителните ендометриални клетки чрез движенията на ресничките им. На стр. 48 “възрастни моноцити”, по-правилно е да се каже зрели или диференцирани моноцити. На стр. 56 “противовъзпалителните фактори като IFNg

TNFa", те са провъзпалителни фактори. Същото се отнася и за IL-17, той е провъзпалителен фактор. Стр 88 – подготовката за имунохистохимично оцветяване включва освен депарафиниране и оводняване. Стр.90 – обикновено хистологични срези се наблюдават с прав микроскоп, инвертният се използва за култури, техническа грешка ли е или наистина наблюдавате хистологични срези с инвертен микроскоп. В раздел Резултати и дискусия: Таблица 4.2 и Фигура 4.4, както и таблица 6.2. и фигура 6.1. съдържат едни и същи данни представени по два различни начина – таблично и графично. Мисля че коефициентът на корелация е неправилно интерпретиран като висок при стойност около 0.5, това е среден по сила коефициент на корелация. За мен лично софтуерно-базираната имунохистохимична *in situ* цитометрия е доста интересен подход за анализ. Мисля обаче, че при имунохистохимичната цитометрия се пропуска една много важна популация имунни клетки, а именно утеринните NK клетки с фенотип CD56++, които не могат да бъдат дефинирани. Другото, което ми липсва в проучването е сравнението на имунните съотношения като предиктори на ендометриална рецептивност между жени с RIF и здрави жени, въпреки, че осъзнавам колко труднодостъпен материал са биопсиите от лутеален ендометриум от здрави жени.

11. Лични впечатления

Личните ми впечатления от Румяна Ганева са прекрасни. Изключително възпитана, сърдечна, отзивчива и интелигентна млада жена. Имала съм възможност да я видя в работна среда и съм възхитена от професионализма, компетентността и отговорността, с която подхожда към работата си в Медицински център "Надежда".

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Аз съм убедена, че Румяна ще използва данните от дисертационния си труд в клиничната практика на МЦ Надежда, имайки предвид, че създаването на този труд е продиктувано именно от нуждата да се помогне на жените с RIF. Тя самата е формулирала насоки за бъдещо приложение на имунните съотношения като предиктори за ендометриална рецептивност като част от алгоритъм за оценка на ендометриалния имунен профил и състоянието на рецептивността на ендометриума при *ин витро* пациенти. Те могат да се използват и в научни проучвания, които изследват ефектите на имунологичните третирания при тези пациентки или за оценката на вече проведена системна или локална терапия вкл. имунотерапия. Използването на имунни индикатори за ендометриална рецептивност, които показват различните аспекти на имунен дисбаланс при всяка отделна пациентка, са крачка към персонализирана медицина, термин който чуваме непрекъснато напоследък. Аз бих препоръчала да се сравнят тези имунни индикатори при жени с RIF и здрави жени естествено заченали, както и при ендометриум в лутеална и пролиферативна фаза при RIF пациентки и здрави жени. Интересно би било да опита да усъвършенства имунохистохимичната цитометрия чрез въвеждане на мултиплексен анализ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за рецензия дисертационен труд е съвременна и навременна научна разработка в област с подчертано клинично значение и силен социален импакт, а именно човешката репродукция и по-специално нейната неефективност при пациентки с повтарящи се имплантационни неуспехи. Разработката е с разумно поставени цели и задачи, релевантна методология, логична структура и отлично изпълнение. Дисертацията успява да даде отговори на повечето поставени въпроси и да отвори нови полета за изследвания във фундаменталната и клиничната сфери. Трудът отговаря на всички изисквания, поставени в ЗРАСРБ и неговия Правилник, както и на специфичните изисквания на Правилника на Софийски университет "Климент Охридски". Въз основа на всичко казано дотук, моята оценка е **ПОЛОЖИТЕЛНА** и препоръчвам убедено на уважаемите членове на научното жури да присъдим образователната и научна степен "Доктор" на Румяна Руменова Ганева по научна специалност „Клетъчна биология", професионално направление: 4.3. Биологични науки, област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика.

08.07.2025 С уважение:
София Т. Димова

Въпроси към докторантката:

1. При оценката на датиране на ендометриалната тъкан чрез експресията на стероидни рецептори опитвали ли сте да дигитализирате позитивния сигнал за по-обективна оценка?
2. При софтуерно-базирания количествен анализ *in situ* резултатите са представени като брой положително оцветени имунни клетки за даден маркер от общия брой стромални клетки. Клетките за анализ са дефинирани и по диаметъра на ядрото. Какво включвате в термина "стромални клетки" – стромалните клетки per se (фибробласти или децидуалните стромални клетки, DSC), или стромални клетки плюс негативните имунни клетки.
3. Как ще интерпретирате относително по-високият коефициент на корелация между NK (CD56+) клетките и цитотоксичните Т-клетки при жени с RIF с успешна имплантация?
4. Как ще обясните по-голямото количество Т-лимфоцити в ендометриума на жени с RIF с неуспешна имплантация, при положение, че няма разлика в Т-хелперните и Т-цитотоксичните субсети (Таблица 4.2)?
5. Интраутеринната апликация на PBMC при жени с RIF води до повишаване на хелперните Т-клетки и съответно на съотношенията Th/T, Th/Tk и Th/МФ, което както показвате пък води до подобряване на рецептивността на ендометриума. Имате ли хипотеза как би могло да се случи?
6. Установявате ли клъстериране на имунните клетки в ендометриума на жени с RIF. Много автори твърдят, че съществува DALT, децидуа-асоциирана лимфоидна тъкан, подобно на асоциирани с останалите мукози лимфоидни системи? Имунните клъстери са местата в които имунните клетки се активират и диференцират.