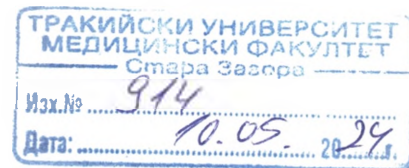


Рецензия



на Дисертационния труд
на тема “Роля на IL-6 за прогнозата и развитието на колоректалния карцином”
на Д-р Димитър Чавдаров Чонов
от Медицинския Факултет на Тракийския Университет
за придобиване на образователната и научна степен
“Доктор”, област на висшето образование 7.0.
Здравеопазване и спорт, професионално направление
7.1. Медицина, докторска програма “Обща хирургия” 03.01.37.
Рецензент; Проф. Цана Петрова Бошнакова-Празникова, дмн.

Дисертационният труд на Д-р Димитър Чонов е посветен на изключително важен проблем в областта на гастроинтестиналната онкология. Ежегодно в целия свят стотици , хиляди болни губят живота си поради колоректален карцином (КРК). Всеки опит за проучване на детайли в хистогенезата на тумора, възможността за своевременното му диагностициране и лечение е от съществено значение за спасяване живота на болните. Изследванията от последните години показват, че лимфоцитите инфилтриращи стромата на туморите произвеждат цитокини, които повлияват пролиферацията на туморните клетки. Доказано е, че свръхекспресията на IL-6 в ракова тъкан корелира с напреднал стадий, свързана е с метастази в лимфните възли и венозна инвазия при глиобластом , рак на простатата и рак на стомаха.

След обширен литературен обзор Д-р Чонов формулира целта на дисертационния труд да изследва експресията на IL-6 в туморни и имунни клетки при КРК и да проследи връзката на серумното ниво на IL-6 с клинично-патологичните характеристики на тумора.

За постигането на тази цел Д-р Чонов си поставя следните задачи:

Да се изследват 104 пациента с КРК ретроспективно и 49 случая проспективно с използване на парафини срезове от тумора, серум на пациента преди операцията за изследване на IL-6 , замразена тъкан и кръв за ДНК анализи.

Да се проучат клиничните данни на болните с КРК от епикризи и данни за лечението.

Да се направи оценка на MSI/микросателитна нестабилност/ състоянието чрез имунохистохимия с антитела срещу MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2.

Обект на изследването са 104 пациента с КРК: 53 мъже и 49 жени на възраст между 35 и 82 години за периода от 1996 г. до 2009 г., оперирани в клиниките по Хирургия на УМБАЛ “Проф. Св. Киркович” гр. Стара Загора. Болните са проследени в продължение на 90,63 месеца. Биопсиите от туморната тъкан, фиксирани във формалин и включени в парафин са оцветени с хематоксилин-еозин. При имунохистохимичното изследване са използвани анти IL-17 и анти CD68 антитела. Извършена е изолация на ДНК, с използване на два метода: 1) стандартния метод и с помощта на комплект за екстракция на ДНК (Macherau Nagel). Извършен е MSI анализ с пет полиморфни маркера и имунохистохимия за

MMR протеини. Осъществена е двойна имунофлуоресценция за IL-17 , STAT3 и CD3/IL-6. Статистическият анализ е извършен с помощта на SPSS, 16.0 за Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Тестът chi-square и Fishers's Exact Test се използват за сравняване на резултатите от имунохистохимичното броење и клиничко патологичните параметри.

Графиките за преживяемост са изготвени чрез теста на Kaplan-Meier, а периодите на преживяемост се сравняват чрез log-rank теста. Приетото ниво на значимост е зададено на $p < 0,005$.

Изследвани са интерлевкин-6 позитивни имунни клетки, нов имунологичен маркер, свързан с развитието на колоректален рак. Изследвани са серумните нива на IL-6 при пациенти с КРК.

Проучени са 153 пациента с КРК - това е цялата група пациенти - 104 от предишното изследване и 49 от проспективното изследване. Пациентите са претърпели резекция по повод открит КРК от 1996 г. до 2019 г. в Отделение по хирургия на УМБАЛ "Проф. Ст. Киркович" Стара Загора.

Извършено е измерване на серумния IL-6 с метода на Elisa на 49 пациенти с КРК и 44 контролни индивида за периода 2017 г. - 2019 г.

Проби от туморна тъкан са взети от инвазивния фронт (ИФ), от самия тумор и от нормална тъкан на дебелото черво и са включени в парафин. Изследвани са туморни срези, оцветени с хематоксилин-еозин, както и имунохистохимично с IL-6 антитяло.

Направен е количествен анализ на имунореактивността в туморната тъкан.

Извършена е имунохистохимия за MMR протеин и двойна имунофлуоресценция за откриване на CD3/IL-6.

Статистическият анализ е осъществен с помощта на SPSS 16.0 за Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Дисертантът успешно съчетава клиничните с имунохистохимичните методи на работа.

Едновременно с морфологичните изследвания е извършено проучване на клиничните епикризи и данните за лечение.

Изследвани са 49 пациента с колоректален рак на възраст между 50 и 88 години и е установена хипертония при 78%, 55% са от кръвна група "А", 27% от група "В" и само 18% от група "0".

Авторът изследва рискови фактори за развитието на КРК като хипертония, захарен диабет и кръвна група при 49 пациента. Повечето болни са с кръвна група "А" и голям процент са с хипертония и диабет II тип.

Могат да се посочат следните приноси, които в по-голямата си част са оригинални.

Авторът установява, че имунните клетки в туморната микросреда позитивни за IL-6 имат протуморна роля, която е статистически значимо повече в късните стадии (III-IV). Успоредно с IL-6 се увеличава броят на STAT2 позитивните имунни клетки в ИФ в ранните стадии на КРК.

Увеличеният брой на тумор-промотиращите имунни клетки IL-6 и Th17 може да е една от причините за по-неблагоприятното протичане на КРК .

Основен принос на дисертационния труд е, че всичките 158 пациента са изследвани за MSI/MSS чрез имунохистохимия. Изследвани са за имуноекспресия на IL-6, STAT3, IL-17 и FOXP3 в имунни клетки на туморната тъкан. Позитивните се оказват повече в по-ранните стадии на туморите и по-малко в напредналите случаи.

Установено е, че експресията на IL-6 е по-изразена в туморните жлези на нискодиференцираните и желатинозните карциноми.

Пациентите с по-голям брой на IL-6 позитивни имунни клетки в тумора имат по-добра прогноза по отношение на тяхната преживяемост.

Серумното ниво на IL-6 е статистически значимо по-високо 88.96 ± 92.13 в сравнение с контролите 31.75 ± 6.19 pg/ml. Следователно серумното ниво на IL-6 е белег за туморна прогресия. То е по-високо при пациенти с КРК в сравнение със здрави индивиди и е от диагностична стойност. За пръв път в българската и световна литература е изследвана комбинацията от IL-6 цитокин, STAT3 транскрипционен фактор, експресирани в имунни клетки в туморната микросреда на КРК. Така дисертантът внася нови данни в научната съкровищница и обогатява литературата с познания за КРК.

Работата е написана на литературен български език. Д-р Чонов е изпълнил поставените в дисертационния труд задачи. Използван е значителен по обем материал с най-модерни съвременни методики, като е отлично документиран. Резултатите от дисертационния труд са публикувани в Open Access Mared J Med Sci 2019, Jul 30, в Български Медицински журнал XV, 2021, №2 и в Biotechnology & Biotechnological Equipment 2022, vol 36 №1 327-338 и така е получил международно признание.

Трудът на д-р Чонов е репрезентативен за високото ниво на работа на Медицинския Факултет при Тракийския университет в който от началото на 2021 г. е приет протокол в Онкодиспансерите за лечение на MSI- КРК с имунни чекпойнт инхибитори. Принос за това е и дисертационния труд на -Д-р Чонов.

Въз основа на всичко гореизложено предлагам убедено на членовете на почитаемия научен съвет да гласуват за присъждане по достойнство на Д-р Димитър Чавдаров Чонов образователната и научна степен "Доктор" по Докторска програма Обща хирургия 03.01.37.

12.12.23 г. .Рецензент  ...Проф.Цана Бошнакова -Празникова дмн.....



Review



Of the PhD thesis

On "Role of IL-6 in prognosis and development of colorectal carcinoma"

To Dr. Dimitar Chavdarov Chonov

From the Medical Faculty of Trakia University

To acquire an educational and scientific degree

"Doctor", field of higher education 7.0.

Healthcare and sports, professional direction 7.1.

Medicine, Doctoral Program "General Surgery" 01.03.37.

Reviewer: Prof. Tsana Petrova Boshnakova-Praznikova, MSD.

The PhD thesis of Dr. Dimitar Chonov is dedicated to an extremely important problem in the field of gastrointestinal oncology. Every year, hundreds and thousands of patients die from colorectal cancer (CRC) worldwide. Every attempt to study the details of the histogenesis of the tumor, the possibility of its timely diagnosis and treatment is essential to save the lives of the patients. Research in recent years has shown that lymphocytes infiltrating the stroma of tumors produce cytokines that influence the proliferation of tumor cells. Overexpression of IL-6 in cancer tissue has been shown to correlate with advanced stage, associated with lymph node metastasis and venous invasion in glioblastoma, prostate cancer, and gastric cancer.

After an extensive literature review, Dr. Chonov formulated the aim of the PhD thesis: to investigate the expression of IL-6 in tumor and immune cells in CRC and to trace the relationship of the serum level of IL-6 with the clinicopathological characteristics of the tumor.

To achieve this goal, Dr. Chonov sets himself the following tasks:

To study 104 patients with CRC retrospectively and 49 cases prospectively using paraffin sections from the tumor, preoperative patient serum for IL-6 assay, frozen tissue and blood for DNA analyses.

To study the clinical data from the disease history of CRC patients and treatment data.

To assess for MSI (microsatellite instability) status by immunohistochemistry with antibodies against MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2.

The object of the study are 104 patients with CRC: 53 men and 49 women aged between 35 and 82 years for the period from 1996 to 2009, operated in the Surgery clinics of UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich" Stara Zagora. The patients were followed up for 90.63 months. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue biopsies were stained with hematoxylin-eosin. Anti-IL-17 and anti-CD68 antibodies were used in the immunohistochemical study. DNA isolation was performed using two methods: 1) the standard method and 2) using a DNA extraction kit (Macheray Nagel). MSI analysis with five polymorphic markers and immunohistochemistry for MMR proteins were performed. Double immunofluorescence was performed for IL-17, STAT3, and CD3/IL-6.

Statistical analysis was performed using SPSS, 16.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). The chi-square test and Fisher's Exact Test were used to compare immunohistochemical count results and clinicopathological parameters.

Survival plots were prepared using the Kaplan-Mayer test, and survival periods were compared using the log-rank test. The accepted level of significance was set at $p < 0.005$.

Interleukin-6 positive immune cells, a new immunological marker associated with the development of colorectal cancer, were investigated. Serum levels of IL-6 in patients with CRC were investigated.

153 patients with CRC were studied - this is the entire group of patients: 104 from the retrospective study and 49 from the prospective study. The patients underwent resection on the occasion of a found CRC from 1996 to 2019 in the Departments of Surgery of UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich" Stara Zagora.

Serum IL-6 was measured by the ELISA method in 49 patients with CRC and 40 control individuals for the period 2017-2019.

Tumor tissue samples were collected from the invasive front (IF), from the tumor itself, and from normal colon tissue, and were embedded in paraffin. Tumor sections stained with hematoxylin-eosin as well as immunohistochemically with IL-6 antibody were examined. Quantitative analysis of immunoreactivity in tumor tissue was performed.

Immunohistochemistry for MMR proteins and double immunofluorescence to detect CD3/IL-6 were performed.

Statistical analysis was performed using SPSS, 16.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). The PhD student successfully combines clinical and immunohistochemical methods of work.

A study of clinical disease history and treatment data was performed concurrently with the morphological studies.

49 patients with colorectal cancer between the ages of 50 and 88 years were studied and hypertension was found in 78%, 55% were of blood group "A", 27% of group "B" and only 18% of group "0".

The author investigated risk factors for the development of CRC such as hypertension, diabetes mellitus and blood group type in 49 patients. Most patients have blood group type "A" and a large percentage have hypertension and type II diabetes.

The following contributions may be cited, which are for the most part original.

The author found that the immune cells in the tumor microenvironment positive for IL-6 have a pro-tumor role, which is statistically significantly more in the late stages (III-IV). In parallel with IL-6, the number of STAT3-positive immune cells in IF increases in the early stages of CRC.

Increased numbers of tumor-promoting immune cells IL-6 and Th17 may be one of the reasons for the more unfavorable course of CRC.

A major contribution of the PhD thesis is that all 153 patients were examined for MSI/MSS by immunohistochemistry. Immunoexpression of IL-6, STAT3, IL-17 and FOXP3 in immune cells of tumor tissue was investigated. The positive ones are more in the earlier stages of the tumors and less in the advanced cases.

IL-6 expression was found to be more pronounced in tumor glands of poorly differentiated and gelatinous carcinomas.

Patients with a higher number of IL-6 positive immune cells in the tumor have a better prognosis in terms of their survival.

Serum IL-6 level was statistically significantly higher 88.6 ± 92.13 compared to controls 31.75 ± 6.19 pg/ml. Therefore, serum IL-6 level is a marker of tumor progression. It is higher in CRC patients compared to healthy individuals and is of diagnostic value.

For the first time in the Bulgarian and world literature, a combination of IL-6 cytokine, STAT3 transcription factor, expressed in immune cells in the tumor microenvironment of CRC was studied. Thus, the PhD student contributes new data to the scientific treasury and enriches the literature with knowledge about CRC.

The work is written in literary bulgarian language. Dr. Chonov has fulfilled the tasks set in the PhD thesis. A significant volume of material was used with the most advanced modern methods, and it was well documented. The results of the PhD thesis were published in Open Access Maced J Med Sci 2019, Jul 30, in Bulgarian Medical Journal XV, 2021. No 2 and in Biotechnology & Biotechnological Equipment 2022, vol 36 No1 327-338 and thus received international recognition.

Dr. Chonov's work is representative of the high level of work of the Faculty of Medicine at Trakia University, in which a protocol for the treatment of MSI CRC with immune checkpoint inhibitors has been adopted since the beginning of 2021 in the Oncologic centres. Dr. Chonov's PhD thesis also contributed to this.

Based on all of the above, I strongly suggest to the members of the honorable scientific council to vote for merit awarding to Dr. Dimitar Chavdarov Chonov the educational and scientific degree "Doctor" in the Doctoral Program General Surgery 01.03.37.

12.12.23

Reviewer:



.Prof. Tsana Boshnakova-Praznikova, dmn