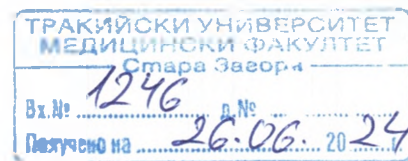


ДО
ПРОФ. Д-Р ЮЛИАН РУМЕНОВ АНАНИЕВ, ДМ
ПРЕДСЕДАТЕЛ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД № 1274/29.03.2024 г.
НА РЕКТОРА НА ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
СТАРА ЗАГОРА



СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Димитър Иванов Буланов, дм – хирург
Катедра Обща и оперативна хирургия, Медицински факултет, МУ-София
Декан на Медицински факултет – МУ, София

Относно: защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в област на висшето образование 7. „Здравеопазване и спорт“, професионално направление 7.1 „Медицина“, научна специалност „Обща хирургия“, код 03.01.37 на тема - *“Роля на IL-6 за прогнозата и развитието на колоректалния карцином”*

Автор на дисертационния труд: д-р Димитър Чавдаров Чонов, асистент в Катедра Пропедевтика на хирургическите болести, Медицински факултет, Тракийски Университет – Стара Загора;

Научен ръководител: Проф. д-р Йовчо Петков Йовчев, дм

Научен консултант: Проф. д-р Мая Владова Гълъбова, дм

Форма на доктурантурата: редовна форма на обучение;

База на провеждане на докторантурата: Катедра Пропедевтика на хирургическите болести, Медицински факултет, Тракийски Университет – Стара Загора

Представения от докторанта комплект материали във връзка с дисертационния труд на хартиен и електронен носител е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на Тракийски университет – Стара Загора.

Д-р Димитър Чавдаров Чонов е роден на 17.10.1985 г. в гр. Стара Загора. През 2011 г. завършва медицина в Медицински факултет на Тракийски Университет, Стара Загора. През 2012 г. започва работа като хирург-ординатор в Хирургично отделение на МБАЛ Стара Загора - ЕАД. От 01.04.2013 г. е специализант по хирургия към Тракийски Университет с база МБАЛ - Стара Загора - ЕАД и през м. май 2018 г. придобива специалност по обща хирургия. През 2017 г. започва работа в ДХО към КООХ, УМБАЛ „Проф. Д-р Ст. Киркович“ АД и от 01.09.2018 г. специализира детска хирургия към МФ на Тракийски Университет с база УМБАЛ „Проф. Д-р Ст. Киркович“ АД. От 01.04.2017 г. е редовен докторант по „Обща хирургия“ в Медицински факултет на Тракийски Университет. През 2018 г. е избран за асистент в Катедрата по пропедевтика на хирургичните болести на МФ, Тракийски Университет. Докторантът е отчислен с право на защита през м. април 2021 г.

Темата за изясняване на ролята на някои ключови цитокини за прогнозата и развитието на колоректалния карцином продължава да е актуална. Колоректалният карцином е третият най-често диагностициран рак в света и една от най-честите причини за смърт.

причинена от рак. Хроничното възпаление в последните години се смята за важен фактор, който участва в инициацията и развитието на туморния процес. IL-6 е важен цитокин, който има както про-възпалителни, така и против-възпалителни функции. IL-6 е също така про-туморен цитокин, който има значение за туморния растеж, инвазия и метастазиране. Има данни, че IL-6 освен в серума се експресира в туморните епителии и в имунни клетки в тумора. Данните от тези изследвания в дисертацията са анализирани и асоциирани с клинично-морфологични показатели при пациенти с КРК. Дисертацията съдържа и изключително съвременното изследване на микросателитната нестабилност. В дискусията е представено кои мутации се изследват при колоректалния карцином понастоящем и е обсъдено използването на комбинирани терапии за лечението на тумора.

Дисертационният труд на д-р Димитър Чонов е написан на 143 стандартни страници с шрифт Times New Roman/12, съдържа 15 таблици и 21 фигури включващи и микроскопски снимки. Структурата му е стандартна и съдържа - увод, литературен обзор, изводи от обзора, цел, задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, библиография, публикации по темата на дисертацията и участия в научни форуми. Библиографската справка обхваща 500 литературни източника, от които 6 на български език и 494 на латиница в печатни издания, голям процент от които са публикувани през последните 10 години в реферирани и индексирани научни списания.

Въведението е кратко, адекватно и определя насочеността на дисертацията.

Литературният обзор е обширен и аналитично представен, с подробни данни за цитокина IL-6 и действията му в туморната микросреда. Описана е секрецията му от различните клетки, както и класическото, и транс-сигнализирането. Описани са про-туморните и против-туморните функции на цитокина. Показана е връзката между STAT3, IL-6, Th17 и FoxP3 имунните клетки в колоректалния карцином. Подробно са представени имуномодулиращият ефект на IL-6 и IL-6-полиморфизмите в тумора. Изводите от литературния обзор мотивират добре хипотезите на научното изследване.

Целта на дисертационния труд е формулирана логично и ясно в две насоки. Да се изследват имунохистохимично, имунни клетки положителни за IL-6, STAT3, IL-17 и FoxP3 при голяма група от пациенти, след което да се търсят корелации с клинични параметри, туморен стадий, MSI статус и преживяемост. Да се изследва серумното ниво на IL-6 при част от пациентите и да се потърси връзка с прогресията на КРК.

Задачите са 6 на брой, представени са стегнато, отговарят на поставената цел и отразяват алгоритъма на проучването.

В следващите глави на дисертационния труд се представят и обсъждат диагностиката и хирургичните методи на лечение, използвани при пациентите с колоректален карцином, както и различните класификации, по които са стадирани пациентите, включително последните редакции на TNM класификацията за карцином на колона от 2018 г. и за карцином на ректума от 2022 г.

В главата „Материал и Методи“ се дава подробно описание на изследваните групи от пациенти с колоректален карцином, компонентите, както и методите на анализ. Представени са таблици с данни за вида на хирургичната резекция и онкологичното лечение. Представени са таблици, в които има клинични и хистологични данни, различните видове стадирание, MSI статус, проследяване на пациентите за определяне на преживяемост. Добре са представени хистологичните, имунохистохимичните и ELISA методите. Статистическите методи са адекватни и подходящи.

В главата „Резултати“, обстойно са представени получените резултати по всяка от поставените задачи. В първата част са представени в таблици и фигури най-често срещаните придружаващи заболявания. Във втората част са представени резултатите от броенето на

имунните клетки и асоциацията с клиничните и патологични параметри. Представени са резултати от анализ на преживяемостта, както и корелации на имунните клетки с MSI статуса. Установено е, че IL-6⁺, STAT3⁺ и Th17⁺ имунни клетки са повече в тумора при пациенти с MSS. Само FoxP3⁺ имунни клетки са статистически значимо по-малко в тумора при пациенти с MSS. В третата част на резултатите са представени данни за нивото на IL-6 в серума на проспективно изследваните 49 пациенти. Установено е, че IL-6 се повишава в серума при пациентите с КРК в сравнение с контролната група. В групата от ретроспективно проучените 104 пациенти и проспективно проучените 49 пациенти, са изследвани имунохистохимично имунните маркери на клетки от туморната микросреда IL-6, STAT3, Th17 и FoxP3. Интересен резултат е, че пациентите с нисък брой IL-6⁺ имунни клетки в инвазивния фронт имат метастази в регионалните лимфни възли и са свързани с по-напреднал стадий на тумора (III+IV), както и данните, че пациентите с по-висок брой на IL-6⁺ имунни клетки в инвазивния фронт и туморната строма на КРК са с по-дълга преживяемост.

В главата „Дискусия“ д-р Чонов прави задълбочен анализ на получените резултати от броенето на имунните клетки, позитивни за IL-6, STAT3, Th17 и FoxP3 и асоциирането на резултатите с клинично-морфологични данни за пациентите. Значим резултат е, че IL-6⁺, STAT3⁺ и Th17⁺ имунни клетки преобладават в инвазивния фронт на КРК и в ранните стадии на карциномите. По-висока преживяемост е установена при пациентите с по-висока плътност на STAT3⁺ и IL-6⁺ имунни клетки в инвазивния фронт. Изследването на IL-6⁺ имунни клетки в туморната микросреда на КРК е ново в световната литература. В последната част от дискусията са описани съвременните терапии на колоректалния карцином, като д-р Чонов се позовава на съвременни литературни източници.

На базата на извършените проучвания, анализ и резултати са формулирани изводи, които съответстват на поставените цел и задачи, и като по-значими от тях се открояват следните:

- Преобладаването на IL-6⁺, STAT3⁺ и Th17⁺ имунни клетки в инвазивния фронт на КРК в сравнение с туморната строма е основание за препоръка, при обработването на пробите от дебело черво да се пускат проби от инвазивния фронт, за да се оцени състоянието на имунния отговор при КРК;

- Детекцията на IL-6⁺, STAT3⁺ и Th17⁺ имунни клетки корелира със стадия на колоректалния карцином, като техният брой в ранните стадии на болестта е повече в сравнение с напредналите стадии на КРК (III+IV);

- Зависимостта между плътността на STAT3⁺ и IL-6⁺ имунни клетки в инвазивния фронт и туморната строма на КРК с преживяемостта на пациентите, както и броя на IL-6⁺ имунните клетки в инвазивния фронт - с метастазирането в регионалните лимфни възли и респективно по-високия туморен стадий показват, че изследването на IL-6⁺ и STAT3⁺ имунни клетки може да се използва като прогностичен фактор за оценяване прогресията на заболяването;

- Корелациите между нивото на IL-6 в серума при пациентите с КРК в случаите с напреднали туморни стадии (III+IV) спрямо контролната група пациенти показва, че то може да се ползва като маркер за туморна прогресия;

Авторът претендира за 9 приноса. Те са с теоретичен, но и научно-приложен характер, някои от тях са с потвърдителен характер и частично се припокриват с изводите. Въпреки тази забележка ги приемам изцяло.

Представения от дисертанта автореферат отговаря на изискванията по отношение на обем, съдържание и структура и съответства на дисертационния труд.

Публикационната дейност на д-р Чонов отговаря на националните изисквания заложи в ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски университет - Стара Загора. Представени са 3 публикации, свързани с дисертационния труд, от които една с импакт фактор - Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3; една с импакт ранк - Open Access Maced J Med Sci SJR=0.260 Q3 и една в българско списание „Български Медицински Журнал“, както и четири участия в научни форуми свързани с темата на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

След подробно запознаване с дисертацията *“Роля на IL-6 за прогнозата и развитието на колоректалния карцином”* и публикациите, свързани с нея давам висока оценка на цялостната работа на докторанта д-р Димитър Чонов. Работата е написана на много добър литературен български език. Считам, че представлява завършено научно изследване с високи научни достойнства и научно-приложна стойност в областта на диагностиката и прогнозата при колоректалния карцином. Съдържанието на дисертацията отговаря на поставените тема, цел и задачи. Материалът е добре и професионално обработен, включително и в статистически аспект, ползвани са съвременни методи на изследване, направени са обосновани изводи, което показва че д-р Чонов притежава качества и умения за планиране и извършване на самостоятелно научно изследване. За пръв път в българската и световна литература е изследвана комбинация от IL-6, STAT3, IL-17 и FoxP3, експресирани в имунни клетки в туморната микросреда на КРК. Така дисертантът внася нови данни, които представляват оригинален принос в науката и обогатяват литературата с познания за КРК.

Въз основа на гореизложеното давам своето положително становище и гласувам „ЗА“ присъждане на ОНС „доктор“ в професионално направление 7.1 Медицина, докторска програма Обща хирургия, шифър 03.01.37 на д-р Димитър Чавдаров Чонов, и приканвам уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително.


Проф. д-р Димитър Буланов, дм

TO
PROF. IULIAN RUMENOV ANANIEV, MD, PHD
CHAIRMAN OF THE SCIENTIFIC JURY
APPOINTED BY ORDER № 1274/29.03.2024
OF THE RECTOR OF TRAKIA UNIVERSITY
STARA ZAGORA



OPINION

By Prof. Dimitar Ivanov Bulanov, MD, PhD - surgeon
Department of General and Operative Surgery, Faculty of Medicine, Medical University - Sofia
Dean of the Faculty of Medicine - MU, Sofia

Regarding: defense of a PhD thesis work for the acquisition of an educational and scientific degree "doctor" in the field of higher education 7. "Health care and sports", professional direction 7.1 "Medicine", scientific specialty "General surgery", code 03.01.37 on the subject - *"Role of IL-6 in the prognosis and development of colorectal carcinoma"*

Author of the PhD thesis: Dr. Med. Dimitar Chavdarov Chonov, assistant professor at the Department of Propedeutics of Surgical Diseases, Faculty of Medicine, Trakia University - Stara Zagora;

Research supervisor: Prof. Yovcho Petkov Yovchev, MD, PhD

Scientific consultant: Prof. Maya Vladova Galabova, MD, PhD

Form: regular form of study;

Base of conducting the PhD course: Department of Propedeutics of Surgical Diseases, Faculty of Medicine, Trakia University - Stara Zagora

The set of materials presented by the PhD student in connection with the PhD thesis in paper and electronic media is in accordance with the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB), the Regulations for the Implementation of the LDASRB and the Regulations for the Development of the Academic Staff of Trakia University - Stara Zagora.

Dr. med. Dimitar Chavdarov Chonov was born on 17.10.1985 in Stara Zagora. In 2011, he graduated in medicine at the Medical Faculty of Trakia University, Stara Zagora. In 2012, he started working as a resident surgeon in the Surgical Department of MHAT Stara Zagora - EAD. Since 01.04.2013, he specializes in surgery at the Trakia University with a base of MHAT - Stara Zagora - EAD and in May 2018 he acquired a specialty in general surgery. In 2017, he started working in the Department of Pediatric Surgery at the General and Operative Surgery Clinic, UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich" AD and since 01.09.2018 he specializes in pediatric surgery at the Faculty of Medicine of Trakia University with base UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich AD. Since 04.01.2017, he is a full-time PhD student in "General Surgery" at the Faculty of Medicine of Trakia University. In 2018, he was elected as an assistant at the Department of Propedeutics of Surgical Diseases of the Faculty of Medicine, Trakia University. The PhD student was dismissed with the right to defense in April 2021.

The topic of elucidating the role of some key cytokines in the prognosis and development of colorectal carcinoma continues to be relevant. Colorectal carcinoma is the third most commonly

diagnosed cancer in the world and one of the leading causes of cancer-related death. In recent years, chronic inflammation has been considered an important factor involved in the initiation and development of the tumor process. IL-6 is an important cytokine that has both pro-inflammatory and anti-inflammatory functions. IL-6 is also a pro-tumor cytokine that is important for tumor growth, invasion and metastasis. There is evidence that, in addition to serum, IL-6 is expressed in tumor epithelia and in immune cells within the tumor. The data from these studies in the dissertation are analyzed and associated with clinico-morphological indicators in patients with CRC. The PhD thesis also contains the extremely modern study of microsatellite instability. The discussion presents which mutations are currently being investigated in colorectal carcinoma and discusses the use of combination therapies for the treatment of the tumor.

The PhD thesis of Dr. Dimitar Chonov is written on 143 standard pages with Times New Roman/12 font, contains 15 tables and 21 figures including microscopic photographs. Its structure is standard and contains - introduction, literature review, conclusions from the review, purpose, tasks, material and methods, results, discussion, conclusions, contributions, bibliography, publications on the topic of the dissertation and participation in scientific forums. The bibliographic reference covers 500 literary sources, of which 6 in Bulgarian and 494 in International referred journals, a large percentage of which have been published in the last 10 years in referred and indexed scientific journals.

The introduction is short, adequate and defines the focus of the PhD thesis. The literature review is extensive and analytically presented, with detailed data on the cytokine IL-6 and its actions in the tumor microenvironment. Its secretion by various cells has been described, as well as classical and trans-signaling. The pro-tumor and anti-tumor functions of the cytokine have been described. The relationship between STAT3, IL-6, Th17 and FoxP3 immune cells in colorectal carcinoma is shown. The immunomodulatory effect of IL-6 and IL-6-polymorphisms in the tumor are presented in detail. The conclusions of the literature review well motivate the hypotheses of the scientific research.

The aim of the PhD thesis is formulated logically and clearly in two directions. To investigate immunohistochemically, immune cells positive for IL-6, STAT3, IL-17 and FoxP3 in a large cohort of patients, then look for correlations with clinical parameters, tumor stage, MSI status and survival. To examine the serum level of IL-6 in a subset of patients and to look for a relationship with CRC progression.

There are 6 tasks. They are concisely presented, meet the set goal and reflect the research algorithm.

The following chapters of the PhD thesis present and discuss the diagnosis and surgical treatment methods used in patients with colorectal carcinoma, as well as the various classifications by which patients are staged, including the latest revisions of the 2018 TNM classification for colon carcinoma and for rectal carcinoma from 2022.

The chapter "Materials and Methods" gives a detailed description of the studied groups of patients with colorectal cancer, the components, as well as the methods of analysis. Tables are presented with data on the type of surgical resection and oncological treatment. Tables are presented with clinical and histological data, different types of staging, MSI status, follow-up period of patients to determine survival. Histological, immunohistochemical and ELISA methods are well presented. Statistical methods are adequate and appropriate.

In the "Results" chapter, the obtained results for each of the task are extensively presented. In the first part, the most common comorbidities are presented in tables and figures. In the second part, the results of immune cell counts and the association with clinical and pathological

parameters are presented. Results of survival analysis as well as correlations of immune cells with MSI status are presented. IL-6⁺, STAT3⁺ and Th17⁺ immune cells were found to be more in the tumor of MSS patients. Only FoxP3⁺ immune cells were statistically significantly less in the tumor of MSS patients. The third part of the results presents data on the level of IL-6 in the serum of the prospectively studied 49 patients. IL-6 was found to be increased in the serum of CRC patients compared to the control group. In the group of retrospectively studied 104 patients and prospectively studied 49 patients, the immune markers of tumor microenvironment cells IL-6, STAT3, Th17 and FoxP3 were investigated immunohistochemically. An interesting result is that patients with low numbers of IL-6⁺ immune cells at the invasive front have regional lymph node metastases and are associated with more advanced tumor stage (III+IV), as well as the data that patients with higher number of IL-6⁺ immune cells in the invasive front and tumor stroma of CRC are associated with longer survival.

In the "Discussion" chapter, Dr. Chonov provides an in-depth analysis of the results obtained from counting immune cells positive for IL-6, STAT3, Th17 and FoxP3 and the association of the results with clinico-morphological data for the patients. A significant result is that IL-6⁺, STAT3⁺ and Th17⁺ immune cells predominate in the invasive front of CRC and in the early stages of carcinomas. Higher survival was found in patients with a higher density of STAT3⁺ and IL-6⁺ immune cells at the invasive front. The study of IL-6⁺ immune cells in the tumor microenvironment of CRC is new in the world literature. In the last part of the discussion, modern therapies for colorectal carcinoma are described, with Dr. Chonov referring to modern literary sources.

On the basis of the conducted studies, analysis and results, conclusions were formulated that correspond to the set goals and objectives, and the following stand out as more significant:

- The predominance of IL-6⁺, STAT3⁺ and Th17⁺ immune cells in the invasive front of CRC compared to tumor stroma warrants the recommendation to collect samples from the invasive front when processing colon specimens to assess the status of the immune response in CRC;

- The detection of IL-6⁺, STAT3⁺ and Th17⁺ immune cells correlates with the stage of colorectal carcinoma, as their number in the early stages of the disease is more, compared to the advanced stages of CRC (III+IV);

- The dependence between the density of STAT3⁺ and IL-6⁺ immune cells in the invasive front and tumor stroma of CRC with patient survival, as well as the number of IL-6⁺ immune cells in the invasive front - with regional lymph node metastasis and higher tumor stage, respectively, show that the study of IL-6⁺ and STAT3⁺ immune cells can be used as a prognostic factor to assess the progression of the disease;

- The correlations between the level of IL-6 in serum in patients with CRC in cases with advanced tumor stages (III+IV) compared to the control group of patients shows that it can be used as a marker for tumor progression;

The author claims 9 contributions. They are of a theoretical, but also of scientific-applied nature, some of them are of a confirmatory nature and partially overlap with the conclusions. Despite this remark, I fully accept them.

The abstract submitted by the PhD student covers the requirements in terms of volume, content and structure and corresponds to the PhD thesis work.

The publication activity of Dr. Chonov covers the national requirements laid down in the LDASRB, the Regulations for its implementation and the Regulations for the development of the academic staff at Trakia University - Stara Zagora. 3 articles related to the PhD thesis are

presented, one of which has an impact factor - Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3; one with an impact rank - Open Access Maced J Med Sci SJR=0.260 Q3 and one in the Bulgarian journal "Bulgarian Medical Journal", as well as four participations in scientific forums related to the topic of the PhD thesis.

CONCLUSION

After a detailed review of the PhD thesis "The role of IL-6 in the prognosis and development of colorectal carcinoma" and the articles related to it, I highly appreciate the overall work of the PhD student Dimitar Chonov. The work is written in a very good literary Bulgarian language. I believe that it represents a completed scientific study with high scientific merits and scientific-applied value in the field of diagnosis and prognosis in colorectal carcinoma. The content of the PhD thesis corresponds to the set topic, goal and tasks. The material was well and professionally processed, including in the statistical aspect, modern research methods were used, justified conclusions were drawn, which shows that Dr. Chonov has the qualities and skills to plan and carry out independent scientific research. For the first time in the Bulgarian and world literature, a combination of IL-6, STAT3, IL-17 and FoxP3, expressed in immune cells in the tumor microenvironment of CRC, was investigated. Thus, the PhD thesis contains new data, which represent an original contribution to science and enrich the literature with knowledge about CRC.

Based on the above, I give my positive opinion and vote "FOR" the awarding of the educational and scientific degree "Doctor" in professional direction 7.1 Medicine, doctoral program General Surgery, code 03.01.37 to Dr. med. Dimitar Chavdarov Chonov, and invite the respected members of the Scientific Jury to vote positively.



Prof. Dimitar Bulanov, MD, PhD