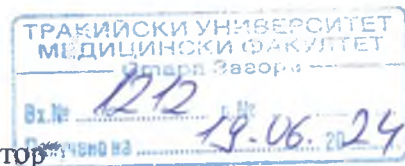


РЕЦЕНЗИЯ



По процедурата за заемане на ОНС „доктор“

По научна специалност „Обща хирургия“ 03.01.37

РЕЦЕНЗЕНТ: доц. Д-р Даниел Георгиев Вълчев, дм

Научна специалност „Гръдна хирургия“

УМБАЛ „Проф. Д-р Стоян Киркович“ Стара Загора,

Катедра по специална хирургия (гръдна хирургия, съдова хирургия и ангиология, детска хирургия и ортопедия и травматология)

Медицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Здравеопазване и спорт 7.0.

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: Обща хирургия 03.01.37

На д-р **Димитър Чавдаров Чонов**

Редовен докторант отчислен с право на защита м. април 2021 г.

Катедра Обща и оперативна хирургия

Тема: **„Роля на IL-6 за прогнозата и развитието на колоректалния карцином“**

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

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

Адрес за контакти:

Стара Загора ул. „Кап. Никола Андреев“ № 31

Електронен адрес: e-mail: dg\_valchev@abv.bg

Телефон: +359 88 409 9501

### **1. Кратки биографични данни на кандидата**

Д-р Димитър Чавдаров Чонов е роден на 17.10.1985 г. в гр. Стара Загора. Средното си образование получава в ГПЧЕ „Ромен Ролан“ Стара Загора с френски език през 2004 г. През 2011 г. завършва медицина в Медицински факултет на Тракийски Университет, Стара Загора. На 04.06.2012 г. започва работа като хирург-ординатор в Хирургично отделение на „МБАЛ-Стара Загора“- ЕАД (Университетска). От 01.04.2013 г. става специализант по хирургия към Тракийски Университет с база „МБАЛ-Стара Загора“- ЕАД (Университетска). От 02.01.2017 г. започва работа в ДХО към КООХ, УМБАЛ „Проф. Д-р Ст. Киркович“ АД. От 01.04.2017 г. е редовен докторант по „Обща хирургия“ в МФ на Тракийски Университет. На 07.03.2018 г. става асистент в Катедрата по пропедевтика на хирургичните болести на МФ, Тракийски Университет. През м. май 2018 г. придобива специалност по обща хирургия. От 01.09.2018 г. до 01.09.2022 г. е специализант по Детска хирургия към МФ на Тракийски Университет с база УМБАЛ „Проф. Д-р Ст. Киркович“ АД. Докторантът е отчислен е с право на защита м. април 2021 г.

### **2. Актуалност на проблема.**

Колоректалният карцином е третият най-често диагностициран рак в света и една от най-честите причини за смърт, причинени от малигнен тумор. По-голямата част от колоректалните карциноми са спорадични случаи (70%) и само (25%) са с унаследени мутации. Хроничното възпаление в последните години се смята за важен фактор, инициращ развитието на туморен процес. IL-6 е важен про-туморен цитокин, който има значение за туморния растеж, инвазия и метастазиране. Изследването му в серума на пациентите, оперирани с колоректален карцином, изследването в туморната микросреда (туморни жлези, имунни клетки) и асоциирането на резултатите с клинично-морфологични и някои имунни и генетични параметри дава нов поглед върху оценката и стадирането на колоректалния карцином и определяне на съвременното лечение.

Изследването на микросателитната нестабилност е съвременно, прието в България от 2021 г. То се използва за определяне на лечението с чек-пойнт инхибитори и при определяне на комбинирани терапии.

Много добре е представено изследването на мутации при колоректалния карцином и определянето на съвременни терапии.

### **3. Характеристика на дисертационния труд**

Дисертационният труд на д-р Димитър Чонов съдържа 143 стандартни страници, написан с височина на шрифта 12 и вид Times New Roman. От съдържанието става ясно, че същият се състои от Увод, Литературен обзор, Изводи от обзора, Цел, Задачи, Материал и Методи, Резултати, Обсъждане, Изводи, Приноси, Библиография и Публикации по темата на дисертацията и участия в научни форуми.

Литературният обзор е разделен на 7 части. Дисертацията започва с две глави, в които се дават подробни данни за IL-6. Описана е секрецията на IL-6 от моноцитите, класическото и транс-сигнализирането. Представени са 2 схеми, които илюстрират IL-6/JAK/STAT3 сигналния път и про-възпалителните и противо-възпалителните функции на IL-6. Описана е връзката между STAT3, IL-6, Th17 и FoxP3 имунните клетки в туморната строма. Описан е имуномодулиращия ефект на IL-6 и IL-6-базираните терапии при колоректалния карцином. Много добре са описани и илюстрирани Т хелперните популации, без знанието, за които не е възможно интерпретирането на имунния процес в туморната микросреда. В трета глава е описана микросателитната

нестабилност, като са дадени критериите на Amsterdam I, II и Bethesda. В четвърта глава е направен обзор на най-често използваните серумни маркери при диагностиката на колоректалния карцином като CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и VEGF.

Следват две глави, в които се обсъжда диагностиката и хирургичните методи, използвани при обработването на пациентите с колоректален карцином. Дадени са и класификациите по които са стадираны пациентите, а именно за карцином на колона от 2018 г. и за карцином на ректума от 2022 г.

В края на обзора е направен алгоритъм за поведение при пациенти с колоректален карцином, в основата на който влиза българският алгоритъм от MORE 2016 г. В края са осъвременени новите изследвания за мутации при колоректалния карцином и химио- и таргетните терапии, които се прилагат понастоящем. Става ясно, че понастоящем трябва да се изследват следните мутации: *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* (V600E), при наличието, на които не се прилага таргетна терапия с анти-EGFR и анти-VEGF антитела. Изследват се още *PIK3CA* мутации, показващи също така резистентност към анти-EGFR терапията. *PIK3CA* мутациите показват също възможност за рецидиви при ректалния карцином. За сега в ОНКО диспансерите се изследва само *KRAS*. Започва изследване на *PIK3CA* мутациите. Познаването на съвременните изследвания на мутациите е необходимо при планиране на лечението на пациентите.

Следва главата „Цел и Задачи“, в която д-р Чонов си поставя за цел да изследва серумното ниво на IL-6 и да свърже клетъчната експресия на IL-6 в туморната микросреда с експресията на STAT3, Th17 и FoxP3 и с клинични параметри и с преживяемостта на пациентите. Важна задача е определянето на микросателитна нестабилност на пациентите и свързването ѝ с преживяемостта и с други клинични и морфологични параметри. Поставена е и задача да се изследват епикризите на пациентите за съпътстващи заболявания (ХИБС, хипертония и захарен диабет) и да се свърже колоректалния карцином с кръвните групи.

**В главата „Материал и Методи“** са описани подробно пациентите с колоректален карцином, които са главно две групи – ретроспективно и проспективно събирани. Ретроспективно събираните пациенти са 104. Проспективно събираните пациенти са 49, от които е взета свежа кръв и серум. В крайна сметка всички пациенти са обединени в група от 153. Всички пациенти имат имунохистохимични изследвания.

Представени са таблици за пациентите, в които има хистологични, хистохимични данни, стадиране, проследяване на пациентите за определяне на преживяемост. Добре са представени, хистологичните, имунохистохимичните и ELISA методите. Статистическите методи са адекватни и подходящи.

**В главата „Резултати“**, където обстойно са представени получените резултати по всяка от поставените задачи. В първата част на резултатите са представени във фигури най-често срещаните съпътстващи заболявания при колоректалния карцином и кръвните групи. Представена е и анатомичната локализация на тумора.

**Като първа част** от резултатите са представени данни за най-честите съпътстващи заболявания и симптоми при КРК. Направена е кръгова диаграма, от която личи, че кръвна група „А“ е най-честата кръвна група при пациенти с КРК. Показано е, че най-честите съпътстващи заболявания са ХИБС, артериална хипертония и захарен диабет. В таблици са представени пациентите с КРК по вид на хирургична резекция, по вид онкологично лечение и всички пациенти са стадираны по класификациите за карцином на колона (от 2018 г.) и за карцином на ректума (от 2022 г.). Това показва, че докторантът е извадил епикризи на всички пациенти от УМБАЛ и за проведеното

лечение от ОНКО диспансера. Данните са щателно обработени. Освен това са намерени данни за обща преживяемост на пациентите.

**Към втората част на резултатите** са представени данни за 104 пациенти, които са събирани ретроспективно в периода 1996 и 2009 година. Резекциите на КРК са изследвани имунохистохимично само, когато е имало достъп до клинични данни за тях и когато тези пациенти са били от област Стара Загора, за които е имало данни в ОНКО-диспансер Стара Загора. Това обстойно събиране на данни дава възможност да се направят значими статистически изследвания. Всички 104 пациенти са изследвани имунохистохимично за имунните маркери на клетки от туморната микросреда IL-6, транскрипционния фактор STAT3, Th17 и FoxP3 от Т хелперите. Всички пациенти са изследвани за микросателитна нестабилност, много съвременно изследване, което определя лечението с чек-пойнт инхибитори. Имайки предвид всичко това, са установени важни корелации. В ранните стадии на КРК (I+II) IL-6 и STAT3 имунните клетки са статистически значимо повече в сравнение с късните стадии (III+IV). IL-6<sup>+</sup> имунни клетки са повече в инвазивния фронт при пациенти с MSS. Същото важи и за STAT3 и Th17 клетките. Само FoxP3<sup>+</sup> клетки са статистически значимо по-малко при MSS пациентите. Важни асоциации са направени на пациентите с по-висока плътност на STAT3<sup>+</sup> и IL-6<sup>+</sup> имунните клетки в инвазивния фронт с по-високата преживяемост. Тази част от дисертацията е публикувана в списание с импакт фактор Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3.

**Към третата част на резултатите** са представени серумни данни за нивото на IL-6 в серума на проспективно събираните 49 пациенти, от които се вижда, че IL-6 се повишава в серума при пациентите с КРК в сравнение с контролната група от 40 пациенти без данни за тумор или друго увреждащо хронично заболяване, което може да доведе до увеличение на IL-6 в серума. Показано е, че нивото на IL-6 в серума се повишава значимо при напредналите тумори (IV хистологичен тип). За пръв път в литературата е показан този резултат.

Обединени са всички пациенти 104 пациенти ретроспективно събирани и 49 пациенти проспективно събирани, като са изследвани имунохистохимично за имунните маркери на клетки от туморната микросреда IL-6, транскрипционния фактор STAT3, Th17 и FoxP3 от Т хелперите. Резултатите са подобни на тези от част 2. Пациентите с нисък брой IL-6<sup>+</sup> имунни клетки в инвазивния фронт имат метастази в регионалните лимфни възли и са свързани с по-напреднал стадий на тумора (III+IV). Важен извод е, че пациентите с по-висок брой на IL-6<sup>+</sup> имунни клетки в инвазивния фронт и туморната строма на КРК са с по-дълга преживяемост (105.60±10.10 месеца v.s. 55.37±7.12 месеца).

В главата „Дискусия“ в рамките на 24 страници 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-морфологичните данни за пациентите. Най-съществената находка е, че IL-6-, STAT3- и Th17-позитивните имунни клетки преобладават в инвазивния фронт на КРК. Това показва, че при обработването на пробите от дебело черво, задължително трябва да се пускат проби от инвазивния фронт. IL-6, STAT3, Th17 имунните клетки преобладават в ранните стадии на КРК. Важни асоциации са направени на пациентите с по-висока плътност на STAT3<sup>+</sup> и IL-6<sup>+</sup> имунните клетки в инвазивния фронт с по-високата преживяемост.

Установено е, че IL-6 се повишава в серума при пациентите с КРК в сравнение с контролната група от 40 пациенти потвърдителен резултат. Важен извод е, че пациентите с по-висок брой на IL-6<sup>+</sup> имунни клетки в инвазивния фронт и туморната строма на КРК са с по-дълга

преживяемост. Изследването на IL-6<sup>+</sup> имунни клетки в туморната микросреда на КРК е ново в световната литература.

Последната част от дискусията разглежда съвременни механизми в развитието на КРК включващи цитокини и имунни клетки в туморната микросреда. Описани са и четирите пътя на колоректална карциногенеза: пътят на хромозомна нестабилност (CIN); пътят на сератния аденом; пътят на микросателитната нестабилност; и пътят на колит-свързания карцином. Обстойно са описани съвременните терапии на колоректалния карцином като д-р Чонов се позовава на съвременни литературни източници.

Следва главата „Приноси“ включваща 9 приноса с теоретичен, научно-приложен и някои с потвърдителен характер.

Дисертацията завършва с библиография съдържаща 500 литературни източника, от които 6 на български език и 494 на латиница в печатни издания, голям процент от които са от последните 10 години, отпечатани в реферирани и индексирани списания.

Дисертацията съдържа 15 таблици и 21 фигури включващи и микроскопски снимки.

#### **Оценка на публикациите и на научния актив**

Д-р Чонов представя 3 публикации, свързани с дисертационния труд: 1 с импакт фактор **Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3**; 1 с импакт ранк **Open Access Maced J Med Sci SJR=0.260 Q3** и една в българско списание „**Български Медицински Журнал**“. Д-р Чонов представя и 4 конгресни участия по темата на дисертацията.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключение мога да обобщя, че настоящата дисертация се отличава със своята актуалност и приложимост. Поставените цел и задачи както и тяхното умело разрешаване във висока степен демонстрира възможностите на д-р Димитър Чонов да анализира, обобщава и прави изводи за връзката между имуноморфологичните показатели и клиничните данни, проследяването на преживяемостта и на други ретроспективно събрани данни. Ролята на IL-6 в диагностицирането, прогнозата и стадирането на колоректалния карцином е изчерпателно представена, като са използвани съвременни методи на изследване.

Въз основа на по-горе изложеното считам, че дисертационният труд на д-р Димитър Чонов представлява напълно завършен научен продукт със значими научно-приложни и диагностични приноси.

Ето защо давам своята положителна оценка и ще гласувам „**ЗА**“ присъждане на ОНС „доктор“ в професионално направление 7.1 Медицина, докторска програма: Обща хирургия шифър 03.01.37 на д-р **Димитър Чонов**, като призовавам и останалите членове на уважаемото Научно жури да гласуват положително.

19.06.2024 г.

доц. Д-р Даниел Георгиев Вълчев, дм





REVIEW

According to the procedure for occupying the educational and scientific degree "Doctor"

On scientific specialty "General surgery" 03.01.37

REVIEWER: Assoc. Prof. Dr. Daniel Georgiev Valchev, PhD

Scientific specialty "Thoracic surgery"

UMHAT "Prof. Dr. Stoyan Kirkovich" Stara Zagora,

Department of Special Surgery (Thoracic Surgery, Vascular Surgery and Angiology, Pediatric Surgery and Orthopedics and Traumatology)

Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora

REVIEW

On a PhD thesis for occupying of the educational and scientific degree "Doctor"

Health and Sports 7.0.

Professional direction: 7.1. Medicine

Doctoral program: General surgery 03.01.37

To Dr. Dimitar Chavdarov Chonov

Full-time PhD student dismissed with the right to defense in April 2021.

Department of General and Operative Surgery

Topic: "Role of IL-6 in the prognosis and development of colorectal carcinoma"

Scientific supervisor: Prof. Dr. Yovcho Petkov Yovchev, MD

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

Contact address:

Stara Zagora St. "Cap. Nikola Andreev" No. 31

Electronic address: e-mail: dg\_valchev@abv.bg

Phone: +359 88 409 9501

## 1. Brief biographical data of the PhD student

Dr. Dimitar Chavdarov Chonov was born on 17.10.1985 in Stara Zagora. He received his secondary education at the "Romain Rolland" State High School in Stara Zagora with French in 2004. In 2011, he graduated from the Faculty of Medicine of Trakia University, Stara Zagora. On June 4, 2012, he started working as a resident surgeon in the Surgical Department of "MHAT-Stara Zagora" - EAD (University). Since 01.04.2013, he specializes surgery at Trakia University with a base "MHAT-Stara Zagora" - EAD (University). From 02.01.2017 he started working in the Department of Pediatric Surgery at the General and Operative Surgery Clinic, UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich AD. Since 04.01.2017, he has been a full-time PhD student in "General Surgery" at the Faculty of Medicine of Trakia University. On March 7, 2018, he became an assistant at the Department of General and Operative Surgery of the Faculty of Medicine, Trakia University. In May 2018, he acquired a specialty in general surgery. From 01.09.2018 to 01.09.2022 he specializes Pediatric Surgery at the Faculty of Medicine of Trakia University based at UMHAT "Prof. Dr. St. Kirkovich AD. The PhD student has been dismissed and has the right to defense in April 2021.

## 2. Relevance of the problem.

Colorectal carcinoma is the third most commonly diagnosed cancer in the world and one of the most common causes of death caused by a malignant tumor. The majority of colorectal carcinomas are sporadic cases (70%) and only (25%) have inherited mutations. In recent years, chronic inflammation has been considered an important factor initiating the development of a tumor process. IL-6 is an important pro-tumor cytokine that is important for tumor growth, invasion and metastasis. Its study in the serum of patients operated on with colorectal carcinoma, the study in the tumor microenvironment (tumor glands, immune cells) and the association of the results with clinico-morphological and some immune and genetic parameters gives new insight into the evaluation and staging of colorectal carcinoma and determination of modern treatment.

The study of microsatellite instability is modern, accepted in Bulgaria since 2021. It is used to determine the treatment with checkpoint inhibitors and in the determination of combination therapies.

The study of mutations in colorectal carcinoma and the determination of modern therapies is very well presented.

## 3. Characteristics of the PhD thesis

The PhD thesis work of Dr. Dimitar Chonov contains 143 standard pages, written in font height 12 and type Times New Roman. It is clear from the content that it consists of an Introduction, Literature Review, Conclusions of the Review, Aim, Tasks, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Contributions, Bibliography and Publications on the topic of the PhD thesis and participation in scientific forums.

The literature review is divided into 7 parts. The PhD thesis begins with two chapters detailing IL-6. IL-6 secretion by monocytes, classical and trans-signaling has been described. 2 schemes are presented that illustrate the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway and the pro-inflammatory and anti-inflammatory functions of IL-6. The relationship between STAT3, IL-6, Th17 and FoxP3 immune cells in the tumor stroma has been described. The immunomodulatory effect of IL-6 and IL-6-based therapies in colorectal carcinoma has been described. T helper populations, without the knowledge of which it is not possible to interpret the immune process in the tumor microenvironment, are very well revealed and illustrated. In the third chapter, microsatellite instability is explained, giving the Amsterdam I, II and Bethesda criteria. In the fourth chapter, an overview of the most commonly used serum markers in the diagnosis of colorectal carcinoma such as CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and VEGF is made.

Two chapters follow that discuss the diagnosis and surgical methods used in the management of patients with colorectal carcinoma. The classifications according to which the patients were staged are also given, namely for colon carcinoma from 2018 and for rectal carcinoma from 2022.

At the end of the review, an algorithm for behavior in patients with colorectal cancer was made, the basis of which is the Bulgarian algorithm from MORE 2016. At the end, the new studies on mutations in colorectal cancer and the chemo- and targeted therapies that are currently applied are updated. It is clear that the following mutations should still be investigated: KRAS, NRAS, BRAF (V600E), in the presence of which targeted therapy with anti-EGFR and anti-VEGF antibodies is not applied. PIK3CA mutations are also being investigated, also showing resistance to anti-EGFR therapy. PIK3CA mutations also indicate the possibility of recurrence in rectal carcinoma. For now, only KRAS is tested in Oncologic centres. Research on PIK3CA mutations begins. Knowledge of current mutation studies is essential when planning patient treatment.

This is followed by the chapter "Aim and Objectives", in which Dr Chonov aims to investigate the serum level of IL-6 and to relate the cellular expression of IL-6 in the tumor microenvironment to the expression of STAT3, Th17 and FoxP3 and to clinical parameters and with patient survival. Determining microsatellite instability in patients and relating it to survival and other clinical and morphological parameters is an important task. A task was also set to examine patients' disease history for comorbidities (CIHD, hypertension, and diabetes mellitus) and to associate colorectal carcinoma with blood groups.

The chapter "Materials and Methods" describes in detail the patients with colorectal carcinoma, which are mainly two groups - retrospectively and prospectively collected. Retrospectively collected patients were 104. Prospectively collected patients were 49, from whom fresh blood and serum were collected. Finally, all patients were combined into a group of 153. All patients had immunohistochemical studies.

Tables are presented for patients with histological, histochemical data, staging, follow-up of patients to determine survival.

Histological, immunohistochemical and ELISA methods are well presented. Statistical methods are adequate and appropriate.

In the "Results" chapter, where the results obtained for each of the tasks are presented in detail. In the first part of the results, the most common comorbidities in colorectal carcinoma and blood groups are presented in figures. The anatomical location of the tumor is also presented.

As the first part of the results, data on the most common comorbidities and symptoms in CRC are presented. A pie chart has been made showing that blood type 'A' is the most common blood type in CRC patients. It has been shown that the most common comorbidities are CIHD, arterial hypertension, and diabetes mellitus. Tables present patients with CRC by type of surgical resection, by type of oncological treatment, and all patients are staged according to the classifications for colon carcinoma (from 2018) and rectal carcinoma (from 2022). This shows that the PhD student took patients' disease history of all patients from UMHAT and for the treatment provided by Oncologic centre. The data is carefully processed. In addition, data on overall patient survival were found.

The second part of the results presents data for 104 patients who were collected retrospectively between 1996 and 2009. CRC resections were examined immunohistochemically only when there was access to clinical data for them and when these patients were from the Stara Zagora region, for whom there was data at Oncologic centre Stara Zagora. This extensive data collection enables meaningful statistical research to be done. All 104 patients were examined immunohistochemically for the immune markers of cells from the tumor microenvironment IL-6, the transcription factor STAT3, Th17 and FoxP3 from T helpers. All patients were screened for microsatellite instability, a very modern test that determines treatment with checkpoint inhibitors. With all this in mind, important correlations have been established. In early stages of CRC (I+II), IL-6 and STAT3 immune cells were statistically significantly more, compared to late stages (III+IV). IL-6<sup>+</sup> immune cells are more at the invasive front in MSS patients. The same is true for STAT3 and Th17 cells. Only FoxP3<sup>+</sup> cells were statistically significantly less in number in MSS patients. Important associations were made of patients with higher densities of STAT3<sup>+</sup> and IL-6<sup>+</sup> immune cells at the invasive front with higher survival. This part of the thesis was published in a journal with impact factor Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3.



In the third part of the results, serum IL-6 level data of the prospectively collected 49 patients were presented, showing that IL-6 was increased in the serum of the CRC patients compared to the control group of 40 patients with no data for a tumor or other disabling chronic disease that may cause an increase in serum IL-6. The level of IL-6 in the serum has been shown to increase significantly in advanced tumors (IV histological type). That result is shown for the first time in the literature.

All patients, 104 patients retrospectively collected and 49 patients prospectively collected, were examined immunohistochemically for the immune markers of tumor microenvironment cells IL-6, transcription factor STAT3, Th17 and T helper FoxP3. The results were similar to those in part 2. Patients with low numbers of IL-6<sup>+</sup> immune cells at the invasive front had regional lymph node metastases and were associated with more advanced tumor stage (III+IV). An important finding is that patients with higher numbers of IL-6<sup>+</sup> immune cells in the invasive front and tumor stroma of CRC had longer survival (105.60±10.10 months vs. 55.37±7.12 months).

In 24-pages in Discussion chapter, Dr. Chonov provides an in-depth analysis of the IL-6, STAT3, Th17, and FoxP3-positive immune cell count results and the association of the results with the clinico-morphological data for the patients. The most significant finding is that IL-6-, STAT3-, and Th17-positive immune cells predominate at the invasive front of CRC. This indicates that when processing colon cancer samples, samples from the invasive front must be released. IL-6, STAT3, Th17 immune cells predominate in the early stages of CRC. Important associations were made of patients with higher densities of STAT3<sup>+</sup> and IL-6<sup>+</sup> immune cells at the invasive front with higher survival.

IL-6 was found to be increased in the serum of the CRC patients compared to the control group of 40 patients, a confirmatory result. An important finding is that patients with higher numbers of IL-6<sup>+</sup> immune cells in the invasive front and tumor stroma of CRC have longer survival. The study of IL-6<sup>+</sup> immune cells in the tumor microenvironment of CRC is new in the world literature.

The last part of the discussion examines modern mechanisms in the development of CRC involving cytokines and immune cells in the tumor microenvironment. All four pathways of colorectal carcinogenesis have been described: the chromosomal instability pathway (CIN); the serrated adenoma pathway; the microsatellite instability pathway; and the colitis-associated carcinoma pathway. Modern therapies for colorectal carcinoma are thoroughly described, as Dr. Chonov refers to modern literary sources.

The chapter "Contributions" follows, including 9 contributions of a theoretical, scientific-applied and some of a confirmatory nature.

The PhD thesis ends with a bibliography containing 500 literary sources, of which 6 in Bulgarian and 494 in International referred journals, a large percentage of which are from the last 10 years, printed in referred and indexed scientific journals.

The PhD thesis contains 15 tables and 21 figures including microscopic photographs.

Evaluation of publications and scientific assets

Dr. Chonov presents 3 publications related to the PhD thesis: 1 with impact factor Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment IF=1.762 Q3; 1 with impact rank Open Access Maced J Med Sci SJR=0.260 Q3 and one in Bulgarian journal "Bulgarian Medical Journal". Dr. Chonov also presents 4 congress presentations on the topic of the PhD thesis.

## CONCLUSION

In conclusion, I can summarize that the present PhD thesis is distinguished by its relevance and applicability. The set goals and tasks, as well as their skillful resolution, demonstrate to a high degree the capabilities of Dr. Dimitar Chonov to analyze, summarize and draw conclusions about the relationship between immunomorphological indicators and clinical data, survival follow-up and other retrospectively

collected data. The role of IL-6 in the diagnosis, prognosis and staging of colorectal carcinoma is comprehensively presented using modern research methods.

Based on the above, I consider that the PhD thesis work of Dr. Dimitar Chonov represents a fully completed scientific product with significant scientific-applied and diagnostic contributions.

That is why I give my positive assessment and will vote "FOR" the awarding of the educational and scientific degree "doctor" in professional field 7.1 Medicine, doctoral program: General surgery code 03.01.37 to Dr. Dimitar Chonov, calling on the other members of the honorable Scientific Jury to vote positively.

19.06.2024

Assoc. Prof. Dr. Daniel Georgiev Valchev, dm

