

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Гено Киров Киров, д. м., д. м н.

на дисертационния труд на тема „Роля на IL-6 за прогнозата и развитието на

колоректалния карцином“

за придобиване на научна степен „доктор“

на дисертанта д-р Димитър Чавдаров Чонов

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

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

Диагностиката и лечението на колоректалния карцином (КЛК) претърпяха значителни промени през последните две десетилетия. Основно се поставя ударение върху ранната диагностика и комбинираното лечение в зависимост от хистологичната находка и стадия на развитие по TMN класификация. Дисертационният труд на д-р Димитър Чонов отразява развитието на КРК, като IL-6 е основен туморен цитокин, който участва в туморния растеж, инвазия и метастазирание. Дисертационният труд е написан на 143 машинописни страници, онагледен е с 15 таблици и 21 фигури, включващи микроскопски снимки. Книгописът е представен от 500 литаратурни източника, от които 6 на кирилица и 494 на латиница.

### Литературен

### обзор

Литературният обзор обхваща 45 машинописни страници. Основното, което се разглежда е IL-6 и развитието на сарциномите, неговото промотиране в растежа на тумора. Голямо внимание се отдава на STAT 3, като основен транскрипционен фактор, който се активира чрез свързване на IL-6 с IL-6 рецептора и участва в диференцирането на моноцити към макрофаги. Отделно IL-6 регулира секрецията на няколко острофазови протеина, като CRP и фибриноген. От значение е инхибирането на IL-6 сигнализацията, което пречи за развитие на тумора. Представя се IL-6 базирана терапия на КРК. Тя включва IL-6 лиганд-блокиращо антитяло, притежавашо противотуморни и противовъзпалителни активности. Описани са няколко класификации на КРК, но основна работна остава TMN с някои допълнения. В диагностично отношение са приложени всички съвременни методи и лабораторни показатели, като изследването на IL-6, Th 17, STAT 3, Fox P3 позитивни имунни клетки в туморната тъкан. Това ще определи и някои показатели за прогнозиране преживяемостта на пациентите. Установено е, че експресията на IL-6 корелира с напреднал стадий, метастази в лимфните възли и венозна инвазия. Всичко това е добър маркер за експресия на карциномите. Най-общо диагностиката на КРК се базира на анамнезата, статуса, фамилната обремененост, лабораторни показатели и всички класически и съвременни ендоскопски и рентгенови методи, включително ПЕТ-КТ и МРТ. В лечебно отношение локализацията на тумора и степента на разпространение насочван за вида на

операция и обема на резекция. Стадият по TNM класификацията определят оперативната тактика, следоперативното поведение и прогнозата. Изследването на имунни клетки в туморната микросреда е от особено значение за лечението на КРК. Определянето на микросателитната нестабилност е част от съвременното лечение, където се прилага комбинирана терапия. Като цяло литературният обзор е съвременен и дава добра насока в модерното лечение на КРК.

**Цел:** Целта на дисертационния труд е логично следствие на заглавието на темата.

**Задачи:** Задачите са шест и са формулирани в съответствие с поставената цел.

**Материал** **и** **методи**  
В клиничното проучване са включени 153 пациенти с КРК провели лечение в УМБАЛ „Проф. Ст. Киркович“, гр. Стара Загора от 1996 до 2019 г. Възрастта варира от 35 до 82 години, като 76 (49,7%) са мъже и 77 (50,3%) са жени. Всички пациенти са оперирани предимно с дясна хемиколектомия. В обзорна таблица са показани пълните клинични и хистологични параметри, локализацията на тумора с неговата диференциация, възпалителен инфилтрат и MMR статус. Представени са имунните клетки STAT 3, IL-6, IL-17 и Fox P3, които се отчитат в 5 зрителни полета. По-нататък се отчитат изолацията на геномната ДНК, имунохистохимията за MMR протеина, двойната имунофлуоресценция за IL-17/STAT 3 и CD 3/IL-6. Статистическият анализ е извършен с помощта на SPSS. Приложени са много съвременни тестове. Прието е ниво на значимост  $p < 0,005$ . От голямо значение са главните клинични и хистологични параметри приложените при пациентите с ретроспективно и проспективно проучване. Средният период на преживяемост е 90,63 месеца. Друг важен момент е изследването на серумния IL-6, като серумната концентрация се определя чрез ELISA.

Взети са тъканни проби както от самия тумор, така и от незасегнато дебело черво. Регистрирани са хистологичната степен на диференциация, лимфоцитната инфилтрация туморната инвазия, патологичния стадий и време на преживяване.

### **Резултати**

В аналитичен план са разгледани придружаващите заболявания, като едно от водещите е артериалната хипертония. Последната изисква своевременно и адекватно лечение, за да се намали риска от постоперативни усложнения. Посочват се имунните клетки, позитивни за IL-6, STAT 3, IL-17 и Fox P3 при развитие на КРК. Разработена е асоциацията на имунните клетки с клиничните патологични параметри, със степента на диференциация и анализ на преживяемостта. Изключително важен е анализът на IL-6-позитивните имунни клетки и новия имунологичен маркер, свързан с развитието на КРК. Доказателство за това е изследването на серумните нива на IL-6 при пациенти с КРК. Повишеното му ниво е статистически значимо свързано с напреднал хистологичен тип на КРК (тип IV) в сравнение с другите хистологични типове (I, II, III), където серумния IL-6 е по-нисък. Повишената експресия на IL-6 в туморните клетки при ниско диференциран КРК може да е признак за лошо развитие на карцинома. Друг важен момент е позитивност на IL-6 в имунните клетки. Пациентите с метастази в регионалните лимфни възли са показали по-нисък брой IL-6 имунни клетки при имунофлуоресценция в сравнение с пациентите без метастази в посочените тъкани.

В заключение дисертантът правилно поставя на първо място адекватното лечение на артериалната хипертония, което намалява рисковете от следоперативни усложнения. Необходимо е да се продължат по-нататъшните проучвания върху имунните процеси при КРК и АВО групите и тяхното въздействие върху злокачествения процес.

### **Дискусия**

В дисертацията са цитирани много автори работещи в областта на КРК. Подчертани са както личното отношение на дисертанта, така и сравнението на неговите резултати с тези на другите съвременни изследователи в тази област. За първи път се открива, че повишеното ниво на IL-6 е статистически значимо, свързано с напреднал хистологичен тип IV КРК. Проведените множество изследвания и анализи в тази област установяват, че повишеното серумно ниво на IL-6 е свързано с туморната инвазия, далечните метастази и напреднал туморен стадий. Открита е корелация между броя на имунните клетки и хистологичния тип, стадия и степента на диференциация и MMS/MSI статуса. Представени са новости в генетичните механизми на развитие на КРК и съвременната терапия – по-специално имунотерапията с имунни чекпойнт инхибитори. Комбинирането на хирургичното лечение със съвременните подходи е отлично представено от дисертанта, като продължава неговото развитие и в бъдеще.

### **Приноси**

- Приемаме следните по-важни приноси:
1. Изследвана е голяма група пациенти с КРК (153) за имуноекспресия на IL-6, STAT 3, IL-17 и FoxP 3 в имунни клетки от туморна тъкан и е определена ролята им в създаване на имunosупресивна среда в КРК.
  2. Изследвана е експресията на IL-6 в туморните клетки и е установено, че тя е по-силно изразена при ниско диференцираните и при желатинозните карциноми.
  3. Имуните клетки, позитивни за IL-6, STAT 3, IL-17 и FoxP 3 са повече в ранните стадии на карциномите и по-малко в напредналите.
  4. Пациентите с по-голям брой на IL-6 позитивни имунни клетки в тумора имат по-добра преживяемост.
  5. Пациентите с MSS имат по-голям брой IL-6, STAT 3 и IL-17 имунни клетки в тумора, докато FoxP 3 са по-малко.
  6. Серумното ниво на IL-6 е статистически значимо по-високо в сравнение с контролите, което е показател за туморна прогресия.
  7. За първи път на световно ниво е изследвана комбинация от IL-6 цитокин, STAT 3 транскрипционен фактор, IL-17 цитокин и FoxP 3 транскрипционен фактор експресирани в имунните клетки на туморната микросреда при КРК.
  8. Основен принос е изследването на всичките 153 пациенти с КРК за MMI/MSS чрез имунохистохимия, което е огромен принос на УМБАЛ „Проф. Ст. Киркович“ – Стара Загора при изследване на нови средства за лечението на КРК.
  9. Направено е обзорно проучване на новите комбинирани терапии при лечението на КРК.

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 публикации в научни списания и 4 участия в международни форуми.

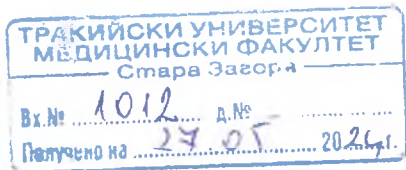
### **Заклучение**

Дисертационният труд на д-р Димитър Чавдаров Чонов е с висока научна и практическа стойност, поради което си позволявам да препоръчам на почитаемото Научно Жури при УМБАЛ „Проф. Ст. Киркович“ – Стара Загора да присъди на дисертанта образователната и научна степен „Доктор“.

15. 05. 2024 г.

  
Проф. Гено Киров Киров, д. м., д. м. н.





## REVIEW

by Prof. Geno Kirov Kirov, MD, PhD, DMSc

of the dissertation work on the topic "Role of IL-6 for the prognosis and development of colorectal carcinoma"

to acquire a scientific degree "doctor" of the doctoral candidate Dr. Dimitar Chavdarov Chonov

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

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

The diagnosis and treatment of colorectal carcinoma (CLC) have undergone significant changes over the past two decades. The main emphasis is on early diagnosis and combined treatment depending on the histological finding and stage of development according to TMN classification. Dr. Dimitar Chonov's dissertation reflects the development of CRC, IL-6 being a major tumor cytokine involved in tumor growth, invasion and metastasis. The dissertation is written on 143 typewritten pages, illustrated with 15 tables and 21 figures, including microscopic photographs. The bibliography is represented by 500 literary sources, of which 6 in Cyrillic and 494 in Latin.

### Literature

### review

The literature review covers 45 typewritten pages. The main one being considered is IL-6 and the development of carcinomas, its promotion in tumor growth. Much attention is paid to STAT 3, as a major transcription factor that is activated by binding of IL-6 to the IL-6 receptor and is involved in the differentiation of monocytes to macrophages. Separately, IL-6 regulates the secretion of several acute phase proteins, such as CRP and fibrinogen. Of importance is the inhibition of IL-6 signaling, which prevents tumor development. IL-6 based therapy of CRC is presented. It includes an IL-6 ligand-blocking antibody possessing antitumor and anti-inflammatory activities. Several classifications of CRC have been described, but the main working one remains TMN with some additions. In terms of diagnostics, all modern methods and laboratory indicators were applied, such as the study of IL-6, Th 17, STAT 3, Fox P3 positive immune cells in the tumor tissue. This will also determine some indicators for predicting patient survival. IL-6 expression was found to correlate with advanced stage, lymph node metastasis, and venous invasion. All this is a good expression marker of carcinomas. In general, the diagnosis of CRC is based on history, status, family history, laboratory parameters, and all classical and modern endoscopic and X-ray methods, including PET-CT and MRI. In terms of treatment, the location of the tumor and the degree of spread guided the type of operation and the volume of resection. The stage according to the TNM classification determines the operative tactics, the postoperative behavior and the prognosis. The study of immune cells in the tumor microenvironment is of particular importance for the treatment of CRC. Determining microsatellite instability is part of modern

treatment where combination therapy is used. Overall, the literature review is up-to-date and provides good direction in the modern treatment of CRC.

**Purpose:** The purpose of the dissertation is a logical consequence of the title of the topic.

**Tasks:** There are six tasks and they are formulated in accordance with the set goal

#### **Material and methods**

The clinical study included 153 patients with CRC who underwent treatment at the UMBAL "Prof. St. Kirković, Stara Zagora from 1996 to 2019. The age ranged from 35 to 82 years, with 76 (49.7%) men and 77 (50.3%) women. All patients were operated primarily with right hemicolectomy. An overview table shows the complete clinical and histological parameters, tumor localization with its differentiation, inflammatory infiltrate and MMR status. Immune cell STAT 3, IL-6, IL-17 and Fox P3 are shown and counted in 5 fields of view. Isolation of genomic DNA, immunohistochemistry for MMR protein, double immunofluorescence for IL-17/STAT 3 and CD 3/IL-6 are further reported. Statistical analysis was performed using SPSS. Many modern tests are applied. A significance level of  $p < 0.005$  was accepted. Of great importance are the main clinical and histological parameters applied to the patients with a retrospective and prospective study. The median survival period was 90.63 months. Another important point is the examination of serum IL-6, the serum concentration being determined by ELISA. Tissue samples were taken from both the tumor itself and the unaffected colon. The histological degree of differentiation, lymphocyte infiltration and tumor invasion, pathological stage and survival time were recorded.

#### **Results**

In an analytical plan, accompanying diseases are considered, one of the leading ones being arterial hypertension. The latter requires timely and adequate treatment to reduce the risk of postoperative complications. Immune cells positive for IL-6, STAT 3, IL-17 and Fox P3 in CRC development are indicated. The association of immune cells with clinicopathological parameters, with the degree of differentiation and survival analysis was developed. The analysis of IL-6-positive immune cells and the new immunological marker associated with the development of CRC is extremely important. Evidence for this is the study of serum levels of IL-6 in patients with CRC. Its increased level is statistically significantly associated with an advanced histological type of KRN (type IV) compared to the other histological types (I, II, III), where serum IL-6 is lower. Increased expression of IL-6 in tumor cells in poorly differentiated CRC may be a sign of poor carcinoma progression. Another important point is IL-6 positivity in immune cells. Patients with regional lymph node metastases showed lower numbers of IL-6 immune cells by immunofluorescence compared to patients without metastases in the indicated tissues. In conclusion, the dissertationer rightly places in the first place the adequate treatment of arterial hypertension, which reduces the risks of postoperative complications. It is necessary to continue further studies on the immune processes in CRC and ABO groups and their impact on the malignant process.

#### **Discussion**

Many authors working in the field of CRC are cited in the dissertation. Both the personal attitude of the dissertation researcher and the comparison of his results with those of other contemporary researchers in this field are emphasized. For the first time, elevated IL-6 level was found to be statistically significantly associated with advanced histological type IV CRC. Numerous studies and analyzes in this field have established that elevated serum IL-6 levels are associated with tumor invasion, distant metastasis, and



advanced tumor stage. A correlation was found between the number of immune cells and histological type, stage and degree of differentiation and MMS/MSI status. Novelty in the genetic mechanisms of CRC development and modern therapy - in particular immunotherapy with immune checkpoint inhibitors - are presented. Combining surgical treatment with modern approaches is excellently presented by the dissertation, continuing its development in the future.

### Contributions

We accept the following more important contributions:

1. A large group of CRC patients (153) was examined for immunoeexpression of IL-6, STAT 3, IL-17 and FoxP 3 in immune cells from tumor tissue and their role in creating an immunosuppressive environment in CRC was determined.
2. The expression of IL-6 in tumor cells was investigated and it was found that it was more strongly expressed in poorly differentiated and in gelatinous carcinomas.
3. Immune cells positive for IL-6, STAT 3, IL-17 and FoxP 3 are more in early stage carcinomas and less in advanced ones.
4. Patients with higher numbers of IL-6 positive immune cells in the tumor have better survival.
5. MSS patients have higher numbers of IL-6, STAT 3 and IL-17 immune cells in the tumor, while FoxP 3 are less.
6. The serum level of IL-6 was statistically significantly higher compared to controls, which is an indicator of tumor progression.
7. For the first time worldwide, a combination of IL-6 cytokine, STAT 3 transcription factor, IL-17 cytokine and FoxP 3 transcription factor expressed in the immune cells of the tumor microenvironment in CRC was studied.
8. The main contribution is the examination of all 153 patients with CRC for MMI/MSS by immunohistochemistry, which is a huge contribution of UMBAL "Prof. St. Kirkovich" - Stara Zagora during the research of new means for the treatment of CRC.
9. An overview study of new combination therapies in the treatment of CRC was made. In connection with the dissertation work, 3 publications in scientific journals and 4 participations in international forums are presented.

### Conclusion

The dissertation work of Dr. Dimitar Chavdarov Chonov is of high scientific and practical value, which is why I allow myself to recommend to the honorable Scientific Jury at UMBAL "Prof. St. Kirkovich" - Stara Zagora to award the doctoral student the educational and scientific degree "Doctor".

15. 05. 2024



Prof. Geno Kirov Kirov, MD, PhD, DMSc