



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**„Biomolecule implicate în progresia tumorală a melanomului
malign cutanat și semnificația lor clinică”**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

DR. LORELEI IRINA BRAȘOVEANU

DOCTORAND:

LUCICA MĂDĂLINA S. CHESNOIU (BOLOVAN)

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT		
INTRODUCERE		1
PARTE TEORETICĂ - FUNDAMENTARE ȘTIINȚIFICĂ		6
CAPITOLUL 1. EPIDEMIOLOGIA ȘI ASPECTELE ANATOMO-PATOLOGICE ALE MELANOMULUI CUTANAT		6
1.1.	Epidemiologia melanomului cutanat	6
1.2.	Factori de risc etiologici	8
	1.2.1. Factori de risc extrinseci	9
	1.2.2. Factori de risc intrinseci	11
1.3.	Caracteristicile biologice ale țesutului cutanat	13
1.4.	Tipuri de melanom malign	15
1.5.	Subtipuri de melanom cutanat	16
1.6.	Forme rare de melanom cutanat	18
CAPITOLUL 2. DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA ȘI TERAPIA MELANOMULUI CUTANAT		20
2.1.	Diagnosticul melanomului cutanat	20
	2.1.1. Diagnosticul clinic	20
	2.1.2. Diagnosticul histopatologic	20
	2.1.3. Diagnosticul molecular	21
2.2.	Stadializarea melanomului cutanat	23
2.3.	Abordări terapeutice în melanomul cutanat	25
CAPITOLUL 3. BIOMOLECULE IMPLICATE ÎN PROGRESIA MELANOMULUI CUTANAT		33
3.1.	Caracteristicile și rolul proteinei circulante S100B	33
3.2.	Caracteristicile și rolul proteinei circulante MIA	36
3.3.	Caracteristicile și rolul proteinelor tisulare MELAN A/MART-1 și GP100/HMB45	39
CAPITOLUL 4. FACTORI IMUNOLOGICI DE PROGNOSTIC AI PROGRESIEI MELANOMULUI CUTANAT		42
4.1.	Rolul și semnificația limfocitelor T, B și celulele NK în evaluarea statusului imun la pacienți cu melanom cutanat	43
4.2.	Semnificația markerilor inflamatori în melanomul cutanat	48
CAPITOLUL 5. PROCESE BIOLOGICE ȚINTITE DE TERAPIA COMBINATĂ A UNOR COMPUȘI CU ACȚIUNE ANTINEOPLAZICĂ		56
5.1.	Procesul de apoptoză în progresia melanomului	56
5.2.	Progresia ciclului celular în melanom	58
5.3.	Compuși naturali utilizați ca agenți terapeutici adjuvanți	59
	5.3.1. Resveratrolul	59
	5.3.2. Quercetina	60
PARTE EXPERIMENTALĂ - CERCETĂRI PROPRII		62
CAPITOLUL 6. PROTEINELE SOLUBILE S100B ȘI MIA ÎN DIFERITE STADII DE EVOLUȚIE ÎN MELANOMUL CUTANAT		63
6.1.	Materiale și metode	63
	6.1.1. Grup de pacienți și probe biologice	63
	6.1.2. Determinarea cantitativă a proteinei solubile S100B prin metoda imunoenzimatică EIA	65

	6.1.3. Determinarea cantitativă a proteinei solubile MIA prin metoda imunoenzimatică ELISA	68
	6.1.4. Analiza statistică	70
6.2.	Rezultate	71
	6.2.1. Caracteristicile statistice ale expresiei proteinelor solubile S100B și MIA	71
	6.2.2. Variația nivelul proteinelor S100B și MIA în funcție de stadiul de evoluție a melanomului cutanat	74
	6.2.3. Analiza corelațiilor dintre concentrațiile proteinelor solubile S100B și MIA	78
6.3.	Discuții	80
6.4.	Concluzii parțiale	83
	CAPITOLUL 7. EXPRESIA PROTEINELOR TISULARE S100, HMB45, MELAN A ȘI CORELAȚIA LOR CU PROTEINELE SOLUBILE S100B ȘI MIA	84
7.1.	Materiale și metode	84
	7.1.1. Grup de pacienți și probe biologice	84
	7.1.2. Determinarea calitativă a proteinelor tisulare specifice melanomului cutanat prin metoda imunohistochimică (IHC)	85
7.2.	Rezultate	86
	7.2.1. Expresia markerilor tisulari S100, MelanA și HMB45	86
	7.2.2. Analiza corelațiilor statistice a biomarkerilor tisulari și solubili specifici melanomului cutanat	92
7.3.	Discuții	94
7.4.	Concluzii parțiale	97
	CAPITOLUL 8. VARIAȚIA LIMFOCITELOR T, B ȘI CELULELOR NK ÎN DINAMICA IMUNOTERAPIEI LA PACIENȚI CU MELANOM MALIGN AVANSAT	98
8.1.	Materiale și metode	98
	8.1.1. Grup de pacienți și probe biologice	98
	8.1.2. Determinarea cantitativă a celulelor sistemului imun prin citometrie în flux (imunofenotipare)	100
8.2.	Rezultate	103
	8.2.1. Caracteristicile statistice a variației populațiilor de celule imune la pacienții cu melanom cutanat avansat	103
	8.2.2. Variația în dinamică a populațiilor limfocitare pe perioada terapiei cu Nivolumab la pacienți cu melanom cutanat avansat.	108
	8.2.3. Raportul de corelație între componentele celulare ale sistemului imun	111
	8.2.4. Raportul dintre variația populațiilor celulare ale sistemului imun și statusul clinic al pacienților	115
8.3.	Discuții	117
8.4.	Concluzii parțiale	119
	CAPITOLUL 9. STUDIUL CORELAȚIILOR DINTRE POPULAȚII LIMFOCITARE, MARKERI INFLAMATORII ȘI MARKERI TUMORALI CIRCULATORI	121
9.1.	Materiale și metode	121
	9.1.1. Grup de pacienți și probe biologice	121
	9.1.2. Determinarea markerilor sistemici inflamatori (NLR, MLR,	121

	PLR, SII, SIRI)	
	9.1.3. Determinarea citokinelor pro-inflamatorii IL-6/TNF-α și a markerilor tumorali serici S100B și LDH	122
9.2.	Rezultate	124
	9.2.1. Studiul corelațiilor statistice dintre celulele imune și markerii inflamatori analizați	124
	9.2.2. Evaluarea eliberării citokinelor IL-6 și TNF-α la pacienți cu melanom avansat tratați cu Nivolumab	128
	9.2.3. Analiza corelațiilor dintre markeri sistemici inflamatori și markerii tumorali solubili studiați	131
9.3.	Discuții	134
9.4.	Concluzii parțiale	136
	CAPITOLUL 10. EFECTELE UNOR AGENȚI MODULATORI ASUPRA LINIEI CELULARE DE MELANOM UMAN SK-MEL-24	138
10.1.	Materiale și metode	138
	10.1.1. Materiale și reactivi utilizați	138
	10.1.2 Cultivarea liniei celulare de melanom uman SK-MEL-24	139
	10.1.3. Metoda colorimetrică (MTS) de evaluare a citotoxicității celulare	142
	10.1.4. Metoda de analiză celulară în timp real (RTCA)	143
	10.1.5. Analiza apoptozei celulare prin metoda citometriei în flux	144
	10.1.6. Evaluarea progresiei ciclului celular prin metoda citometriei în flux	145
	10.1.7. Evaluarea eliberării citokinelor IL-6 și TNF-α prin metoda imunoenzimatică ELISA	146
	10.1.8. Analiza expresiei genice prin metoda cantitativă Real-Time PCR (qRT-PCR)	146
	10.1.9. Analiza statistică	149
10.2.	Rezultate	149
	10.2.1. Evaluarea citotoxicității celulare indusă de tratamente asupra celulelor de melanom SK-MEL-24	149
	10.2.2. Analiza în timp real a activității celulelor de melanom sub acțiunea tratamentelor individuale sau combinate	152
	10.2.3. Evaluarea expresiei genice asociate proceselor biologice studiate	155
	10.2.4. Evaluarea modulării apoptozei în celulele de melanom SK-MEL-24	159
	10.2.5. Evaluarea modulării ciclului celular în celulele SK-MEL-24	163
	10.2.6. Evaluarea modulării eliberării citokinelor IL-6 și TNF-α de către celulele SK-MEL-24	164
10.3.	Discuții	166
10.4.	Concluzii parțiale	170
	Concluzii generale	172
	Bibliografie	176
	Listă de figuri și tabele	201
	Diseminarea rezultatelor	207

INTRODUCERE

Melanomul cutanat (MC) este unul dintre cele mai agresive forme de cancer de piele, caracterizat prin heterogenitate genetică crescută, evoluție imprevizibilă, rezistență la terapie, incidență în continuă creștere și o rată a mortalității care rămâne la valori ridicate, în ciuda utilizării noilor terapii moleculare. La nivel global, conform proiecțiilor statistice, până în anul 2040 incidența melanomului cutanat va crește cu 50% de noi cazuri, iar numărul deceselor cu până la 68%, dacă se păstrează direcția ascendentă înregistrată în prezent. Principalul factor de risc al apariției melanomului este expunerea la radiațiile ultraviolete (UV) care determină 60-70% dintre cazuri, iar secundar, predispoziția familială sau fenotipul cutanat mai sensibil la expunerea solară, pot crește vulnerabilitatea față de inducerea transformării melanocitelor în celule tumorale (Arnold M., 2022; Waseh, S., 2023). Prin urmare, există o reală nevoie de îmbunătățire a capacității de evaluare a prognosticului MC, știind că, diagnosticul precoce și evaluarea riscului de progresie tumorală reprezintă factori care influențează semnificativ creșterea ratei de supraviețuire. În prezent, numeroase studii explorează valoarea de prognostic pentru noi biomolecule cu rol în evaluarea riscului de progresie tumorală sau de predicție a răspunsului la terapia sistemică, care să determine creșterea eficienței monitorizării bolii și individualizarea strategiei terapeutice.

Un alt aspect deosebit de important care justifică nevoia de investigare este reprezentat de faptul că, în melanomul cutanat avansat, metastazele la distanță rămân principala cauză a deceselor determinate de melanom și în ciuda noilor terapii moleculare cu beneficii remarcabile, rezistența la terapie continuă să determine rezultate clinice nefavorabile. Rata de supraviețuire s-a îmbunătățit semnificativ după aprobarea utilizării în terapia melanomului avansat a anticorpilor monoclonali specifici, care țintesc punctele de control imun, precum antigenul 4 asociat limfocitelor T citotoxice (CTLA-4) în anul 2011, și ulterior, în anul 2014, a anticorpilor specifici pentru proteina-1 a morții celulare programate (PD-1), (Borst, J., 2021; Boutros, A., 2024; Gao, M., 2024). Cu toate acestea, deși, terapia ICI a determinat creșterea substanțială a beneficiilor clinice a acestor pacienți, nu toate tumorile au prezentat regresie în urma imunoterapiei, sau rezultatele clinice nu au fost la fel de durabile pentru toți pacienții. Procentul pacienților cu beneficii pe termen lung se apreciază a fi cuprins între 20-40% când agenții imunoterapeutici sunt administrați ca monoterapie, și poate crește până la 60%, atunci când agenții inhibitori ai punctelor de

control imun (ICI) sunt combinați; însă, restul pacienților tratați similar, au dezvoltat rezistență la tratament. Depășirea rezistenței tumorale față de terapia sistemică reprezintă obiectivul a numeroase cercetări, având în vedere agresivitatea cu care are loc invazia tumorală la nivelul altor organe aflate la distanță, uneori chiar și pentru cazurile când excizia tumorii primare de melanom s-a realizat în stadiile inițiale de dezvoltare (Machiraju, D., 2021; Thornton, J.; 2022).

Având în vedere aceste preocupări și stadiul actual al cunoașterii factoriilor care pot influența progresia tumorală a melanomului cutanat sau care pot contribui la creșterea capacității de evaluare a riscului de progresie, în prezenta teză de doctorat sunt investigate biomolecule care prezintă potențial de biomarkeri, din categoria biomarkerilor serologici, biomarkeri din circulație ca produși ai țesutului tumoral și biomarkeri tisulari, care pot reprezenta surse valoroase în monitorizarea evoluției bolii, încă din stadiile inițiale, sau în predicția răspunsului la imunoterapie a pacienților cu melanom cutanat avansat.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul tezei de doctorat a constat în evaluarea expresiei unui set de biomolecule implicate în progresia tumorală, urmărindu-se evidențierea variației lor la nivel circulator sau tisular, simultan cu evaluarea statusului imun și inflamator la pacienți cu melanom cutanat, în diferite stadii de evoluție și tratament, cu semnificație în evaluarea prognosticului bolii.

Obiectivele principale ale tezei s-au axat pe două direcții:

1. Evidențierea relației dintre nivelul biomarkerilor solubili specifici melanomului cutanat cu diferitele stadii de evoluție al bolii și stabilirea posibilelor corelații cu markeri imunohistochimici tisulari, utilizați în diagnosticul și prognosticul melanomului cutanat. De asemenea, s-a urmărit caracterizarea răspunsului imun sistemic în timpul terapiei cu inhibitori ai punctelor de control imun, anti-PD-1, prin analiza în dinamică a principalelor subpopulații limfocitare și a relației lor de asociere cu markeri inflamatori sau tumorali din circulație, analizați la pacienți diagnosticați cu melanom cutanat avansat.

2. Realizarea unui model experimental *in vitro* cu scopul evaluării efectelor oncolitice a unor agenți cu potențial anti-tumoral, evaluate în linia celulară de melanom uman SK-MEL-24 și evidențierea modificărilor induse la nivelul proceselor de diviziune celulară, proliferare, apoptoză, eliberarea de citokine și expresia unor gene implicate în adeziunea celulară, rezistența la tratament sau apoptoză.

Pentru realizarea obiectivelor propuse, studiile s-au desfășurat în mai multe etape, urmărind următoarele **obiective specifice**:

➤ Cuantificarea și evaluarea expresiei proteinelor solubile S100B și MIA ca biomarkeri ai progresiei tumorale la pacienți diagnosticați cu melanom cutanat și evidențierea tipului de corelații stabilite între nivelul seric/plasmatic al acestor proteine cu diferitele stadii de evoluție a bolii.

➤ Identificarea și analiza potențialelor corelații dintre biomarkerii tumorali de la nivel circulator (S100B, MIA) și markeri tisulari specifici melanomului cutanat (S100, MelanA, gp100/HMB45) ca markeri de diagnostic și prognostic, utilizați frecvent în rutina histopatologică prin analiza imunohistochimică (IHC).

➤ Evidențierea în dinamică a variației nivelului principalelor fenotipuri limfocitare (limfocitele T totale ($CD3^+$), limfocitele T helper ($CD3^+CD4^+$), limfocitele T supresoare/citotoxice ($CD3^+CD8^+$), raportul dintre limfocitele T helper/T citotoxice ($CD4^+/CD8^+$), receptorii pentru limfocitele B totale ($CD19^+$) și celulele NK ($CD3^+CD16^+/CD56$) pe perioada terapiei cu anticorpi monoclonali anti-PD1 (Nivolumab), la pacienți cu melanom cutanat avansat.

➤ Explorarea posibilelor corelații dintre populațiile/subpopulațiile de celule imune, markerii inflamatori sistemici (indicele sistemic imuno-inflamator (SII), indicele inflamator al răspunsului sistemic (SIRI), raportul dintre neutrofile/limfocitele (NLR), trombocite/limfocite (PLR) și monocite/limfocite (MLR), markerii pro-inflamatori (citokinele IL-6, TNF- α) și/sau markerii tumorali (lactat-dehidrogenaza (LDH), proteina S100B) cu semnificație în evaluarea și monitorizarea progresiei melanomului pe perioada imunoterapiei.

➤ Modularea și evidențierea efectelor citolitice induse asupra liniei celulare de melanom uman SK-MEL-24 de către compuși citotoxici - Carboplatin, Paclitaxel, inhibitori ai punctelor de control imun - Nivolumab, Ipilimumab sau compuși naturali - Resveratrol și Quercetină, administrați în diferite combinații de tratament, prin evaluarea proliferării celulare vs. citotoxicității celulare dependente de compus.

➤ Evaluarea influenței modulatorilor incluși în studiu asupra apoptozei, fazelor ciclului celular, eliberarea de citokine (IL-6, TNF- α) în supernatantele culturilor celulare sau a expresiei genelor care codifică proteine implicate în procesele de adeziune celulară (molecula de adeziune intercelulară 1/ICAM-1), rezistența celulară la tratament (mdr-1/glicoproteina-P, protectina/CD59) sau apoptoză (mdm-1, p53, bcl-2).

ORIGINALITATEA LUCRĂRII

➤ Tema de doctorat abordează diferite aspecte de natură moleculară care contribuie, prin asocierea lor, la realizarea unei sinteze de informații cu semnificație în stabilirea prognosticului evoluției melanomului cutanat.

➤ Pe parcursul tezei sunt explorate variațiile unui set original de componente celulare și moleculare implicate în transformarea și invazia tumorală, al căror nivel serologic sau tisular, coroborat cu stadiul de evoluție și caracteristicile histopatologice, pot conduce la creșterea capacității de evaluare a riscului de progresie tumorală, precum și la stabilirea unei conduite terapeutice adaptată caracteristicilor bolii pentru fiecare pacient.

➤ Analiza statistică aprofundată a condus la evidențierea unor corelații statistice semnificative stabilite între proteine eliberate în circulație ca produși ai activității celulelor tumorale, răspunsului sistemului imun înnăscut și adaptativ, simultan cu evaluarea răspunsului inflamator, în contextul stimulării sistemului imun cu anticorpi anti-PD-1, aspecte care reflectă atât activitatea tumorală, cu potențialul său de agresivitate, cât și activitatea anti-tumorală a organismului.

➤ Elaborarea unui model experimental original *in vitro* care demonstrează efectele citotoxice exercitate de un panel divers de compuși, utilizați în diferite combinații, concentrații și timpi de administrare, cu scopul de obține cele mai eficiente condiții pentru efecte maxime de liză a celulelor tumorale din cultura de melanom uman, investigate prin folosirea unei palete largi de tehnici moderne, optimizate și adaptate scopului urmărit (culturi celulare, teste imuno-enzimatice, citometrie în flux, teste de proliferare și citotoxicitate, analiză celulară în timp real (RTCA), qRT-PCR).

PARTEA EXPERIMENTALĂ – CERCETĂRI PROPRII

1. PROTEINELE SOLUBILE S100B ȘI MIA ÎN DIFERITE STADII DE EVOLUȚIE ÎN MELANOMUL CUTANAT

1.1. Materiale și metode

1.1.1. Grupul de pacienți și probe biologice

În studiu a fost evaluat, retrospectiv, nivelul seric al proteinei S100 și cel plasmatic al proteinei MIA, pe un grup de 176 de pacienți, dintre care 78 femei și 98 bărbați, cu media de vârstă de $56.2 \pm 12,08$ ani, înregistrați în perioada 2016-2022, la Institutul Oncologic *Prof. Dr. Alex. Trestioreanu*, București, diagnosticați cu melanom cutanat în diferite stadii de evoluție. Studiile au fost realizate în conformitate cu Declarația de la Helsinki și aprobate de Comisia de Etică a Institutului Oncologic *Prof. Dr. Alex. Trestioreanu*, București (cod de etică înregistrat cu numerele 21317/24.11.2016, 13463/26.06.2020).

Probele biologice incluse în lotul de studiu au fost reprezentate de sânge periferic din care s-au obținut fracțiunile de ser și plasmă. Recoltarea și prelucrarea probelor s-a realizat în funcție de etapa clinică a pacientului, respectiv: pre/postoperator, control periodic sau în perioada de terapie (imunoterapie).

1.1.2. Determinarea cantitativă a proteinei solubile S100B prin metoda imunoenzimatică (EIA)

Determinarea cantitativă a proteinei S100B din ser s-a realizat utilizând kit-ul CanAg S100 EIA (*Enzyme Immunoassay*), producător Fujirebio Diagnostics AB, Göteborg, Suedia. Aceasta metodă imuno-enzimatică este de tip necompetitiv, se desfășoară în două etape și are la bază doi anticorpi monoclonali specifici pentru epitopi diferiți (S100A1B și S100BB) exprimați de S100.

1.1.3. Determinarea cantitativă a proteinei solubile MIA prin metoda imunoenzimatică (ELISA)

Pentru investigarea proteinei MIA s-a utilizat kit-ul de imunodetecție prin fotometrie denumit human MIA ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*), produs de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania, care permite determinarea cantitativă a proteinei MIA umană din ser sau plasmă, utilizând placi căptușite cu streptavidină.

1.2. Rezultate și discuții

Rezultatele au fost interpretate în funcție de stadiul de evoluție al bolii și au fost organizate în 4 subgrupe de pacienți (stadiul I, II, III, IV), iar în funcție de sex, pe alte 2

subgrupe (femei și bărbați). În figura 1 sunt reprezentate grafic procentele pacienților care au prezentat valori ale proteinelor S100B și MIA peste limitele normale, acestea fiind analizate pentru fiecare stadiu de evoluție al bolii.

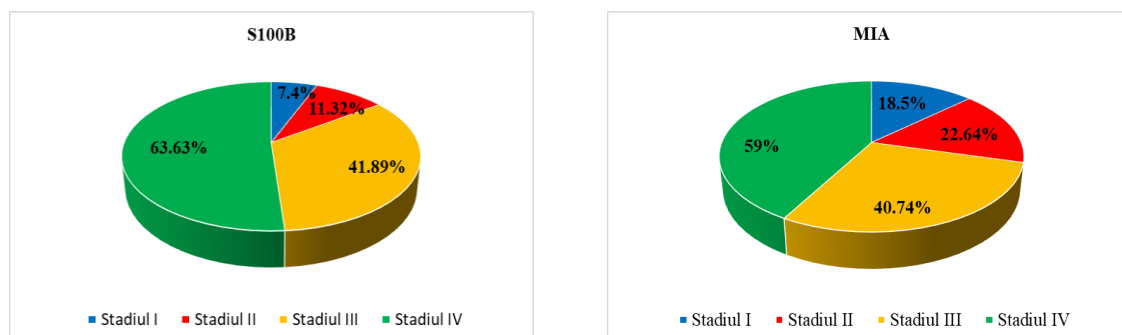


Figura 1. Procentul pacienților care au prezentat valori mai mari decât valoarea de referință pentru proteinele S100B și MIA, în funcție de stadiul de evoluție al bolii

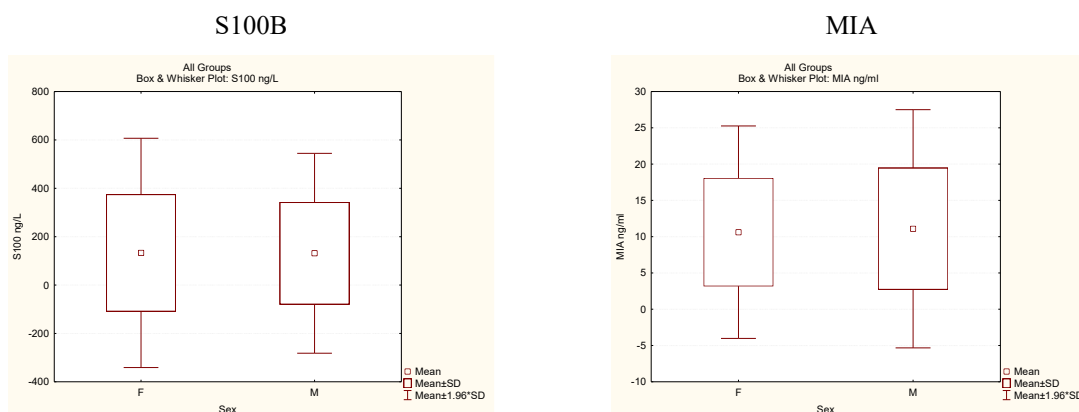


Figura 2. Reprezentarea grafică valorilor din circulație a proteinele S100B și MIA în funcție de sex a grupului de pacienți

În ceea ce privește nivelul concentrațiilor proteinei S100B și proteina MIA, între femei și bărbați, nu s-au evidențiat diferențe semnificative, însă s-a determinat o deviație standard mai mare pentru proteina S100B în grupul de femei, iar pentru proteina MIA în grupul de bărbați. De asemenea, concentrațiile crescute simultan ale proteinelor S100B și MIA pentru 40,90% dintre pacienții din stadiul IV dovedesc și susțin corelația dintre nivelul sangvin al celor doi markeri, această corelație fiind confirmată de coeficientul r de corelație Pearson obținut pentru S100B vs. MIA, $r = 0,662$, $p < 0,001$.

2. EXPRESIA PROTEINELOR TISULARE S100, HMB45, MELAN A ȘI CORELAȚIA LOR CU PROTEINELE SOLUBILE S100B ȘI MIA

2.1. Materiale și metode

2.1.1. Grup de pacienți și probe biologice

Evaluarea expresiei celulare a markerilor S100, MelanA, HMB45 a fost efectuată pe secțiuni de țesut de melanom, obținute în urma intervenției chirurgicale de la 76 de pacienți care fac parte din grupul principal de studiu (n = 176). Fragmentele de leziuni cutanate au fost recoltate din diferite zone ale corpului; trunchi (n = 38), membre superioare (n = 11) și inferioare (n = 18), cap și gât (n = 4), bazin/șolduri (n = 5), pentru care au fost evaluați prin analiza imunohistochimică (IHC) cei trei markeri specifici melanomului.

2.1.2. Determinarea calitativă a proteinelor tisulare specifice melanomului cutanat prin metoda imunohistochimică (IHC)

Metoda IHC se bazează pe detectarea și localizarea de antigene pe secțiuni de țesut tumoral având la bază principiul de legare specifică antigen-anticorp (Ag-Ac). Țesutul tumoral analizat a fost supus etapelor de fixare, colorare și vizualizare la microscop. Analiza imunohistochimică a fost efectuată utilizând un set de trei Ac primari (1) anti-S100 (clonă: 4C4.9) (2) anti-MelanA (clonă: A103) (3) anti-melanosom gp100 (clonă: HMB45).

2.2. Rezultate și discuții

Rezultatele au fost analizate prin structurarea lor pe trei subgrupe, în funcție de expresia pozitivă a proteinelor S100, MelanA și HMB45, respectiv: grup pentru fiecare marker, grup pentru țesut cu 2 markeri pozitivi și grup cu 3 markeri. În tabelul 1 sunt redate rezultatele pentru întregul grup de pacienți (n=76) și pentru grupurile care includ câte un marker tisular în asociere cu nivelul din circulație al celor două proteine solubile S100B și MIA.

Tabel 1. Asocierea dintre concentrația proteinelor S100, MIA din circulație și expresia tisulară individuală a markerilor S100, HMB45 și/sau MelanA

	IHC grup n (%)	S100 tisular n (%)	HMB45 tisular n (%)	MelanA tisular n (%)
Numar de pacienți	76	51	61	65
MIA solubilă				

MIA ⁽⁺⁾	31 (40,79%)	22 (43,14%)	24 (39,34%)	28 (43,07%)
MIA ⁽⁻⁾	45 (59,21%)	29 (56,86%)	37 (60,66%)	37 (58,46%)
S100B solubilă				
S100B ⁽⁺⁾	15 (19,74%)	11 (21,57%)	7 (11,48%)	12 (18,46%)
S100B ⁽⁻⁾	61 (80,26%)	40 (78,43%)	54 (88,52%)	53 (81,53%)
S100B + MIA solubile				
S100B ⁽⁺⁾ /MIA ⁽⁺⁾	9 (11,84%)	7 (13,73%)	4 (6,56%)	8 (12,31%)
S100B ⁽⁺⁾ /MIA ⁽⁻⁾	6 (7,89%)	4 (7,84%)	3 (4,92%)	4 (6,15%)
S100B ⁽⁻⁾ /MIA ⁽⁺⁾	22 (28,95%)	15 (29,41%)	20 (32,79%)	20 (30,77%)
S100B ⁽⁻⁾ /MIA ⁽⁻⁾	39 (51,32%)	25 (49,02%)	34 (55,73%)	33 (50,77%)

MIA⁽⁺⁾ – concentrația proteinei MIA este mai mare decât valoarea de referință (9,4ng/mL); MIA⁽⁻⁾ – concentrația proteinei MIA este mai mică decât valoarea de referință; S100B⁽⁺⁾ – concentrația proteinei S100B este mai mare decât valoarea de referință (90 ng/L); S100B⁽⁻⁾ – concentrația proteinei S100B este mai mică decât valoarea de referință;

Studiul markerilor de la nivel circulator specifici melanomului, simultan cu evaluarea la nivel tisular a evidențiat faptul că pacienții care au avut proteina MIA la nivel circulator cu valori peste limita normală au prezentat expresie tisulară pozitivă pentru proteina S100 în 43,14% dintre cazuri; 39,34% din cazuri au fost pozitive pentru proteina HMB45 și 43,07% din probe au exprimat proteina MelanA. De asemenea, s-a observat că pacienții ale căror valori de S100B și MIA au fost în limite normale la nivel circulator (S100B⁽⁻⁾/MIA⁽⁻⁾) au exprimat simultan cei trei markeri tisulari în aproximativ 55% dintre probele de țesut de melanom. Analiza corelațiilor statistice a arătat că cel mai ridicat coeficient r de corelație s-a obținut între HMB45 și MelanA ($r = 0,623$), dar și între S100 și MelanA ($r = 0,610$), ambele corelații având un grad de semnificație statistică puternică, cu valoarea $p < 0,001$.

3. VARIAȚIA LIMFOCITELOR T, B ȘI CELULELE NK ÎN DINAMICA IMUNOTERAPIEI LA PACIENȚI CU MELANOM MALIGN AVANSAT

3.1. Materiale și metode

3.1.1. Grupul de pacienți și probe biologice

În studiu au fost incluși 20 de pacienți (13 femei/7 bărbați, medie de vârstă: $57,5 \pm 12,6$ ani) diagnosticați cu melanom malign cutanat, aflați în stadiile III ($n = 8$) și IV ($n = 12$) și un lot de control format din voluntari sănătoși ($n=20$). Probele biologice au fost reprezentate de sânge periferic recoltat în dinamică pe tot parcursul studiului, de la pacienți cu melanom avansat tratați cu Nivolumab. Simultan au fost determinate hemoleucograma

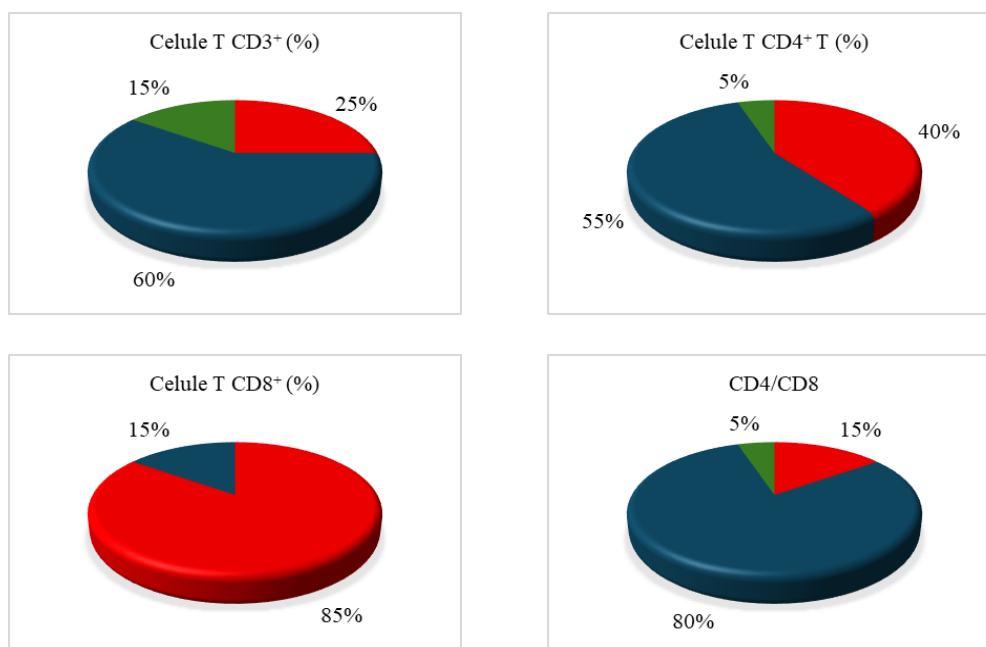
completă, analizele biochimice, analiza de imunofenotipare limfocitară, efectuate pentru toate probele recoltate în dinamică ($n = 104$).

3.1.2. Determinarea cantitativă a celulelor sistemului imun prin citometrie în flux (imunofenotipare)

Experimentele de evaluare a expresiei receptorilor limfocitari s-au efectuat folosind kitul BD StimulTest™IMK PLUS (Becton Dickinson & Co., BD Biosciences, San Jose, USA). Acest kit utilizează metoda de imunofluorescență directă prin marcarea cu doi fluorocromi, izotiocianatul de fluoresceină (FITC) și ficoeritrina (PE), necesari pentru identificarea populațiilor și subpopulațiilor limfocitare din sângele periferic și a permis determinarea procentului celor trei populații: limfocite T ($CD3^+$), limfocite B ($CD19^+$) și celule NK ($CD16^+/CD56^+$).

3.2. Rezultate și discuții

Subseturile limfocitare T, limfocitele B și celulele NK au fost determinate pentru fiecare pacient pentru minim 3 cicluri de administrare a Nivolumab. În figura 3 sunt reprezentate pentru fiecare parametru imunologic proporția (%) pacienților care au înregistrat un trend de creștere, staționar sau de scădere a valorilor, determinate pe perioada terapiei cu Nivolumab și a monitorizării imunofenotipurilor limfocitare.



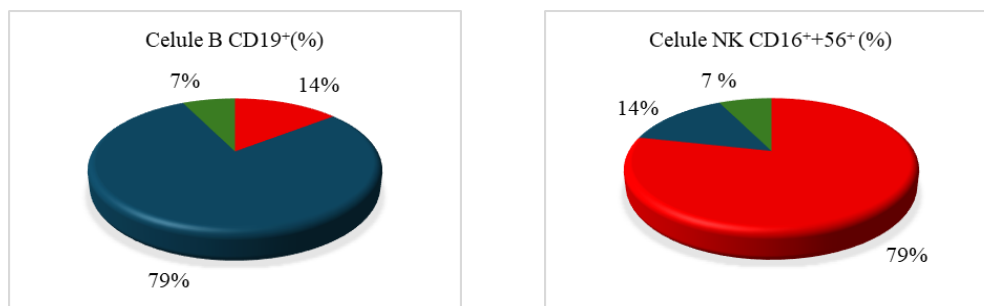


Figura 3. Reprezentarea populațiilor celulelor imune și procentul pacienților asociat cu direcția de variație a fenotipurilor analizate.

Legenda de culori: procentul de pacienți care au înregistrat status staționar (verde), cu panta de creștere (roșu) sau descreștere (albastru) în statusul subpopulațiilor celulare.

Analiza statistică pentru stabilirea raportului de asociere dintre componentele sistemului imun studiate au arătat următoarele interrelații:

- limfocitele T $CD3^+$ s-au corelat puternic, pozitiv cu limfocitele T $CD4^+$
- limfocitele T $CD3^+$ s-au corelat puternic, negativ cu celulele NK $CD16^+CD56^+$
- limfocitele $CD19^+$ s-au corelat moderat pozitiv cu raportul $CD4^+/CD8^+$ și puternic negativ cu limfocitele T $CD8^+$ și celulele NK $CD16^+CD56^+$
- raportul $CD4^+/CD8^+$ s-a corelat puternic pozitiv cu celulele T $CD4^+$ și negativ cu celulele T $CD8^+$
- limfocitele T $CD4^+$ au fost moderat negativ corelate cu celulele NK

Valorile coeficientului r Pearson și semnificația statistică prin valoarea p sunt prezentate în figura 4.

SIRI	0.000											
SII	0.868	0.000										
NLR	0.834	0.892	0.000									
MLR	0.602	0.410	0.384	0.000								
PLR	0.747	0.871	0.700	0.479	0.000							
$CD3^+$	-0.230	-0.168	-0.402	-0.117	0.159	0.000						
$CD19^+$	-0.316	-0.315	-0.334	0.066	-0.190	-0.033	0.000					
$CD4^+$	-0.227	-0.275	-0.368	0.009	-0.177	0.475	0.329	0.000				
$CD8^+$	0.011	0.121	-0.100	-0.088	-0.017	0.585	-0.505	-0.272	0.000			
$CD16^+56^+$	0.037	0.043	0.111	-0.191	-0.046	-0.820	-0.498	-0.443	0.003	0.000		
$CD4^+/CD8^+$	-0.081	-0.186	-0.113	0.038	-0.116	-0.139	0.442	0.656	-0.777	-0.220	0.000	
	SIRI	SII	NLR	MLR	PLR	$CD3^+$	$CD19^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD16^+56^+$	$CD4^+/CD8^+$	

$r = -1$ / Corelație Pearson negativă  $r = 1$ / Corelație Pearson pozitivă

Figura 4. Corelograma Heatmap pentru analiza coeficienților de corelație r dintre componentele celulare imune analizate la pacienți cu melanom avansat, tratați cu Nivolumab

Din analiza rezultatelor s-a observat corelația negativă dintre celulele NK și limfocitele B CD19⁺, aceasta este susținută de rezultatele obținute prin analiza trendului de variație, care a arătat o scădere a procentului de limfocite B prezente în circulație, cu mențiunea că variația s-a păstrat între limitele normale pentru toți pacienții, în timp ce procentul celulelor NK a prezentat un trend de creștere pe durata tratamentului cu Nivolumab. De asemenea, procentul limfocitelor T citotoxice CD8⁺ și celulelor NK a crescut moderat pe perioada imunoterapiei cu Nivolumab, iar 30%, respectiv 15% dintre acești pacienți au prezentat valori mai mari decât limita normală superioară pentru cei doi parametri analizați. Menținerea în limite normale a limfocitelor B sugerează stabilitatea răspunsului imun în ceea ce privește acțiunea anti-tumorală prin producția de Ac sau funcția de prezentare antigenică și sunt asociate cu un prognostic bun de evoluție a bolii.

4. STUDIUL CORELAȚIILOR DINTRE POPULAȚII LIMFOCITARE, MARKERI INFLAMATORI ȘI MARKERI TUMORALI CIRCULATORI

4.1. Materiale și metode

4.1.1. Grup de pacienți și probe biologice

Grupul de pacienți analizat a fost reprezentat de același grup de pacienți diagnosticați cu melanom în stadiile III și IV ($n = 20$) tratați cu Nivolumab, pentru care s-a efectuat analiza fenotipurilor celulelor imune, din totalul de probe ($n=104$) au fost selectate probe recoltate la interval de 3 luni.

4.1.2. Determinarea markerilor inflamatori sistemici (NLR, MLR, PLR, SII, SIRI)

Au fost calculate următoarelor raporturi pe baza datelor furnizate de hemoleucograma completă din probele de sânge periferic: raportul neutrofile/limfocite (NLR), raportul monocite/limfocite (MLR), raportul trombocite/limfocite (PLR), indicele sistemic imun-inflamator (SII), indicele sistemic al răspunsului inflamator (SIRI).

4.1.3. Determinarea cantitativă a citokinelor pro-inflamatorii IL-6, TNF- α și a markerilor tumoral serici S100B și LDH

Detectia nivelului seric al citokinelor IL-6 și TNF- α s-a realizat utilizând kiturile imunoenzimatic Human IL-6 și Human TNF-alpha Uncoated ELISA, produse de

Invitrogen, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria. Din aceleasi probe s-au determinat concentrațiile proteinelor S100B și lactat dehidrogenaza (LDH).

4.2. Rezultate și discuții

Analiza corelațiilor dintre populațiile celulelor imune și indicii inflamatori a evidențiat următoarele asocieri: corelație moderată, negativă, între raportul NLR și limfocitele T CD3⁺, T CD4⁺ și limfocitele B CD19⁺; corelație moderată, negativă, între indicii SIRI și SII cu limfocitele B CD19⁺; corelație puternică, pozitivă, între SIRI și SII; corelație puternică, pozitivă, dintre SIRI/SII cu NLR, MLR și PLR. În figura 5 sunt prezentate graficele pentru patru dintre corelațiile evidențiate în urma analizei statistice.

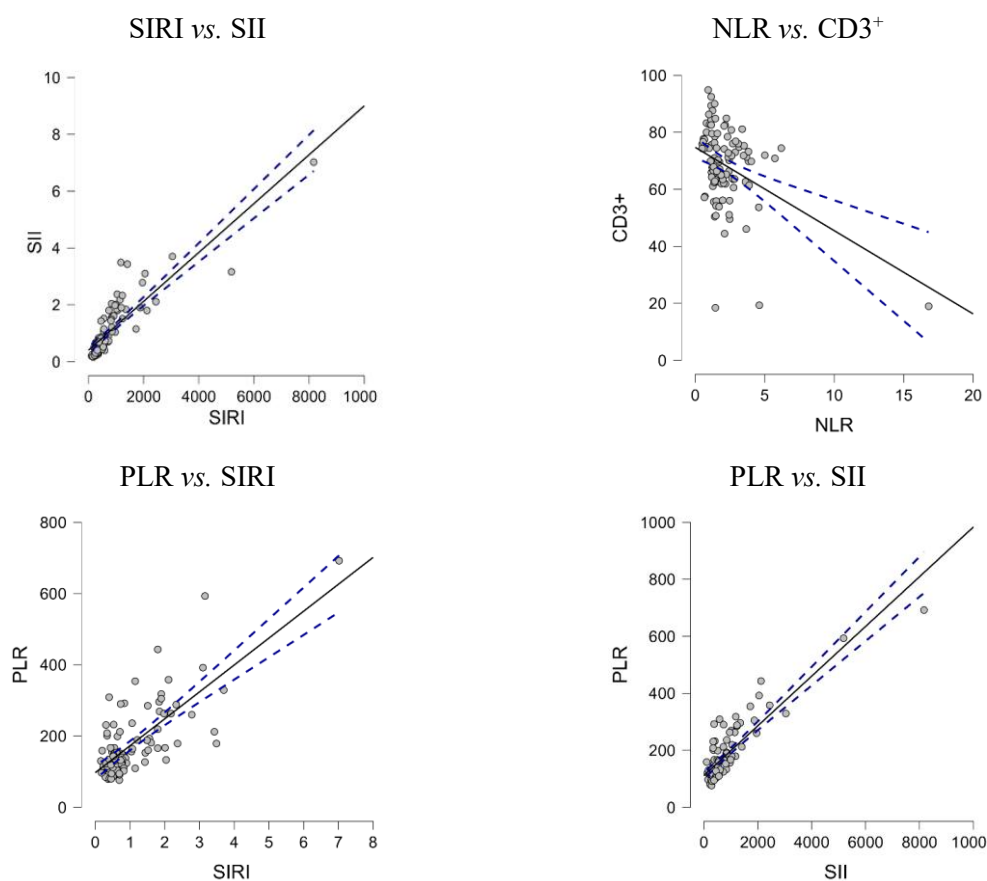


Figura 5. Corelațiile stabilite între factorii inflamatori și populațiile/subpopulațiile de celulele imune analizate (— curbă de regresie liniară; --- linie de egalitate).

Simultan cu evaluarea în dinamică a factorilor inflamatori pe perioada imunoterapiei, s-a realizat și analiza variației eliberării celor două citokine pro-inflamatorii implicate în progresia tumorală, IL-6 și TNF- α , pe aceleași 3 probe de ser recoltate de la același pacient, selectate la interval de 3 luni T1-T3. În dinamica eliberării citokinei IL-6, concentrațiile au scăzut odată cu creșterea numărului de cicluri de tratament, de la proba

T1 până la proba T3, sugerând o influență pozitivă a terapiei de stimulare a răspunsului imun, care conduce la scăderea factorilor pro-inflamatori favorizanți ai creșterii și invaziei tumorale (Figura 6). Variația nivelului concentrațiilor proteinelor TNF- α din circulație pe perioada imunoterapiei au fost nesemnificative atât între cele 3 momente ale recoltării, dar și față de lotul de control (Figura 7).

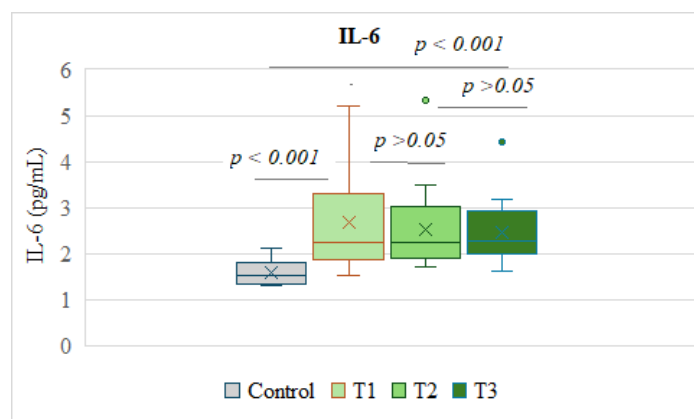


Figura 6. Dinamica variației nivelului citokinei IL-6 circulatorii, pe parcursul terapiei cu Nivolumab, pentru 3 puncte de recoltare (T1, T2, T3) la un interval de 3 luni.

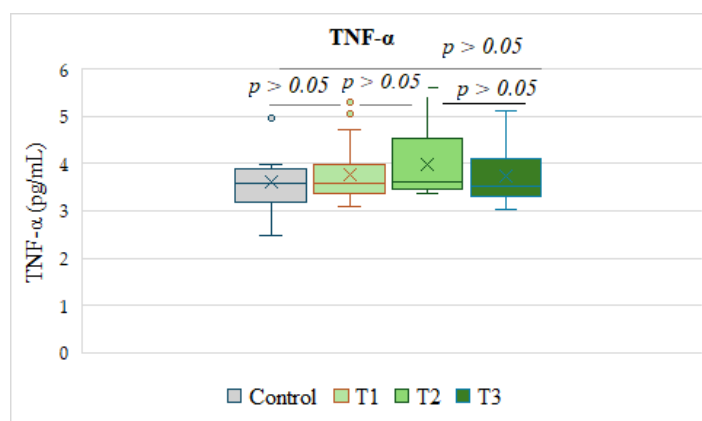


Figura 7. Dinamica variației nivelului citokinei TNF- α circulatorii, pe parcursul terapiei cu Nivolumab, pentru 3 puncte de recoltare (T1, T2, T3) la un interval de 3 luni.

Analiza corelațiilor dintre markerii sistemici inflamatori și markerii tumorali solubili studiați a evidențiat că nivelul seric al enzimei LDH s-a corelat direct cu proteina S100 ($r = 0,483$, $p < 0,01$) și citokina IL-6 ($r = 0,600$, $p < 0,001$), susținând implicarea celor trei componente serice în favorizarea procesului de progresie tumorală, ținând cont de rolul fiecărei biomolecule, dar și în rezistența la imunoterapie, confirmând valoarea de factori de predicție/prognostic al evoluției bolii (Figura 8). Nivelul TNF- α nu s-a corelat cu niciunul dintre cei doi markeri inflamatori, iar IL-6 a stabilit o corelație pozitivă slabă cu SIRI ($r = 0,297$, $p < 0,01$), dar nu și cu indicele SII.

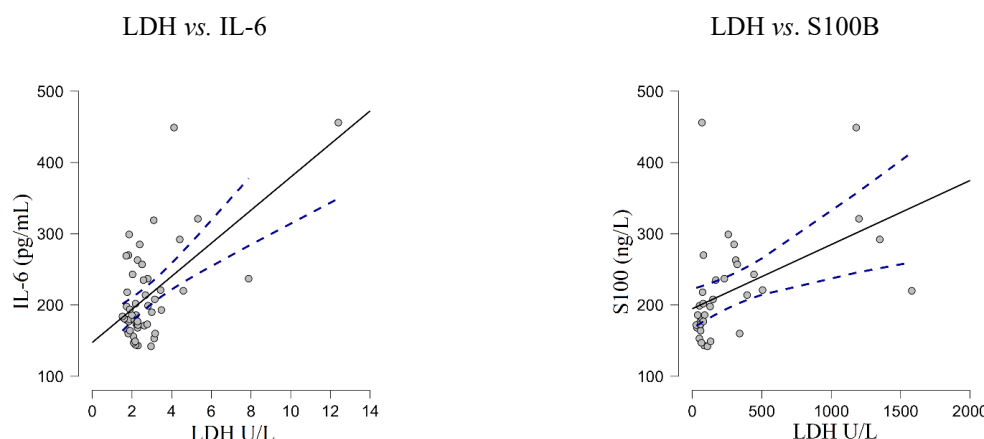


Figura 8. Analiza corelațiilor dintre LDH vs. IL-6; LDH vs. S100B; (— curbă de regresie liniară; --- linie de egalitate).

5. EFECTELE UNOR AGENȚI MODULATORI ASUPRA LINIEI CELULARE DE MELANOM UMAN SK-MEL-24

5.1. Materiale și metode

5.1.1. Dezvoltarea modelului experimental in vitro

- *Modelul experimental in vitro* a fost realizat pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24, aderentă, cu morfologie stelată, dezvoltată din țesut metastatic de la nivelul ganglionului limfatic excizat de la un pacient caucazian (bărbat, 67 de ani) diagnosticat cu melanom malign American Type Culture Collection (ATCC® HTB-71™, Manassas, VA, USA).

- *Cultivarea liniei celulare de melanom SK-MEL-24* s-a realizat în mediu DMEM:F12 cu 10% SFB, 2 mM L-Gln și amestec de antibiotice (penicilină/streptomicină), folosindu-se plăci de cultură de 25 sau 75 cm², urmată de incubarea 24 h/ 37°C într-o atmosferă cu 5% CO₂ și umiditate 95%.

- *Tratamente:* După aproximativ 24 h de cultură, când confluința celulară este de aproximativ de 70% - 80%, celulele au fost tratate timp de 24 - 48h cu diferite concentrații de compuși oncolitici (Carboplatin, Cpt, Paclitaxel, Pxl), anticorpi monoclonali (Nivolumab, Niv; Ipilimumab, Ipi) și compuși naturali (resveratrolm, Rsv; Quercetină, Qct), administrați atât individual, cât și în combinații.

5.1.2. Evaluarea viabilității celulare

S-a realizat prin metoda colorimetrică (MTS) folosind kit-ul CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, (Promega, Madison, WI, SUA) care

permite identificarea celulelor active metabolic ce au capacitatea de reducere a compusului MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu] la produsul formazan. Ulterior perioadei de incubare, produsul de reacție colorat a fost cuantificat spectrofotometric prin măsurarea absorbanței la lungimea de unda $\lambda = 492$ nm pe un cititor de plăci Dynex ELISA (DYNEX Technologies—MRS, Chantilly, VA, SUA). Viabilitatea celulelor tratate a fost exprimată procentual în raport cu celulele netratate (NT), acestea din urmă fiind considerate celule de control cu viabilitatea de 100%. Formula de calcul folosită a fost următoarea:

Viabilitatea celulară (%) = $100 \times (T - B) / (C - B)$, unde T reprezintă densitatea optică a celulelor tratate, C este densitatea optică a celulelor netratate (control), iar B este densitatea optică a mediului de cultură fără celule (blank).

Liza celulară a fost exprimată pe baza rezultatelor viabilității celulare, utilizând formula:

$$\text{Liza celulară (\%)} = 100\% - \text{viabilitate celulară (\%)}$$

Experimentele s-au realizat în triplicat ($n = 3$) și rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard (SD), posibilele reacții nespecifice dintre MTS și compușii studiați au fost eliminate prin măsurarea absorbăței în absența celulelor și scăzute din analiza finală.

5.1.3. Metoda analizei celulare în timp real (RTCA)

Tehnica RTCA se bazează pe folosirea sistemului xCELLigence (DP) (ACEA Biosciences, USA) și tehnologia matricelor electronice de senzori celulari, ceea ce permite monitorizarea în timp real a mai multor activități celulare, precum proliferarea celulară vs. citotoxicitate, aderența, invazia sau migrarea celulară. Orice modificare la nivelul morfologiei sau de aderență celulară determină alterarea indicelui celular (CI), acesta reprezentând o măsură cantitativă a numărului de celule dintr-un godeu.

5.1.4. Analiza apoptozei și progresiei ciclului celular

Evaluarea apoptozei s-a realizat prin metoda de detecție cu dublă marcăre (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Becton Dickinson (BD) Biosciences, Mountain View, CA, SUA) cu Anexină-FITC și PI; modularea fazelor ciclului celular s-a realizat prin marcarea celulelor cu PI (soluția FxCycle PI/Rnase, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen Life Technologies Corporation, Hillsboro, OR, SUA), ambele fiind urmate de achiziția datelor prin citometrie în flux utilizând echipamentul BD FACS Canto II și software Diva 6.2. instalat pe flow- citometru. Evaluarea evenimentelor apoptotice și necrotice s-a realizat cu software-ul Diva 6.2, iar estimarea conținutului ADN din nucleii și fazele ciclului celular cu ajutorul software-ului ModFITLT 2.3 (Verity Software House, Topsham, ME, SUA).

5.1.5. Determinarea eliberării citokinelor IL-6 și TNF- α

S-a realizat prin metoda imunoenzimatică ELISA și a permis evidențierea impactului tratamentelor singulare sau combinate asupra secreției celor două citokine, comparativ cu celulele netratate. Cuantificarea acestor proteine a fost realizată utilizând kit-urile human IL-6 și TNF- α uncoated ELISA (Invitrogen, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

5.1.6. Evaluarea expresiei genice prin tehnica qRT-PCR

Expresia genică s-a evaluat prin metoda TaqMan pentru o serie de gene care codifică proteine implicate în procese biologice care favorizează creșterea și dezvoltarea celulelor de melanom, sau rezistența la terapia antitumorală, respectiv TP53, ABCB1, ICAM1, CD59, BCL2, MDM1, cu ajutorul metodologiei în fluorescență TaqMan (qRT-PCR). Au fost utilizate: kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germania) pentru purificarea ARN; High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SUA) pentru revers-transcripția ARN în cADN; TaqMan – sonde pentru genele țintă analizate. Reacția de amplificare PCR a fost realizată utilizând 20 ng de ADNc total într-o reacție cu un volum total de 25 μ L, utilizând sistemul ChromoFour Real Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SUA). Toate experimentele au fost efectuate în triplicat. Rezultatele au fost normalizate în raport cu gena GAPDH și calculate folosind metoda $2^{-\Delta C_t}/2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5.1.7. Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programele GraphPad Prism versiunea 10.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviația standard (SD), utilizând analizele Student t-test și ANOVA. Valorile $p < 0.05$ au fost considerate statistic semnificative. Analiza corelațiilor s-a făcut prin calcularea coeficientului Pearson de corelație (r), iar corelațiile au fost clasificate în funcție de valorile r după cum urmează: $r \leq \pm 0.29$, corelație slabă, $\pm 0.3 \leq r \leq \pm 0.49$, corelație moderată, $\pm 0.5 \leq r \leq \pm 1$ corelație puternică.

5.2. Rezultate și discuții

➤ *Evaluarea citotoxicității celulare indusă de tratament asupra celulelor de melanom SK-MEL-24*

Au fost analizate efectele fiecărui compus asupra viabilității celulare și s-a constatat ca efectele induse variază într-un mod dependent de doză și timpul de administrare. Viabilitatea celulelor tumorale de melanom uman SK-MEL-24 a fost mai redusă în urma

tratamentului realizat la 48h în comparație cu viabilitatea celulelor tumorale tratate la 24h cu aceiași compuși (Figura 9).

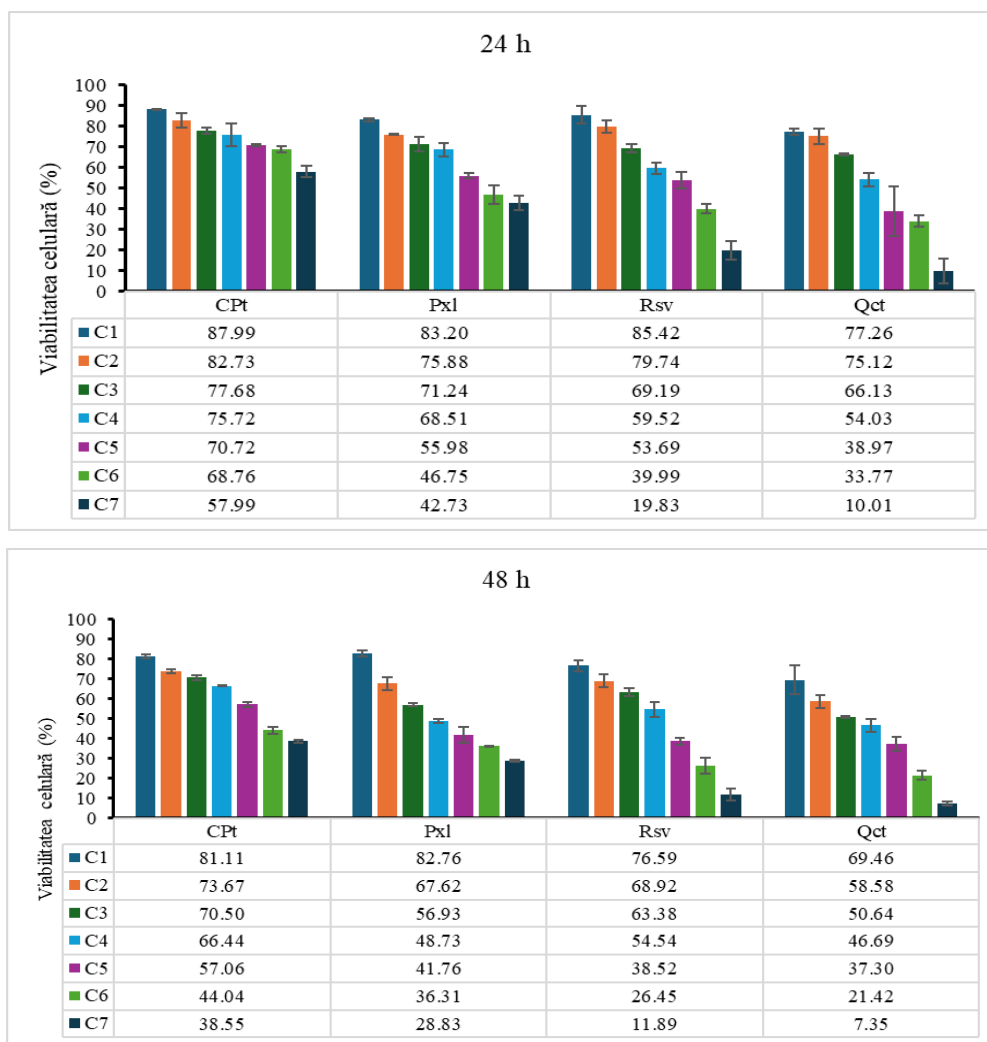


Figura 9. Viabilitatea celulelor de melanom SK-MEL-24, tratate 24 si 48 h cu concentrații crescătoare de CPT, Rsv, Qct și Pxl

Administrarea compuşilor pentru 48 h a determinat creşterea efectelor anti-proliferative ale acestor compuşi comparativ cu tratamentele de 24 h. Pe baza rezultatelor obținute în urma testului MTS, exprimate ca procente de viabilitate celulară şi însoţite de valorile SD ($\pm$), au fost calculate valorile IC_{50} şi IC_{75} pentru fiecare compus testat pe linia de melanom uman SK-MEL-24 (Tabel 2). Valorile IC_{50} şi IC_{75} reprezintă concentrațiile fiecărui compus, necesare pentru a inhiba creşterea celulară cu 50%, respectiv 75%, prezentate ca medie $\pm$ SD:

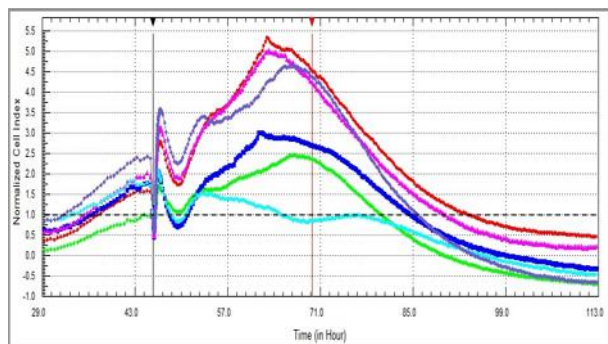
Tabel 2. Valorile IC_{50} şi IC_{75} care induc liza celulelor SK-MEL-24

Compus	IC_{50}	IC_{75}
--------	-----------	-----------

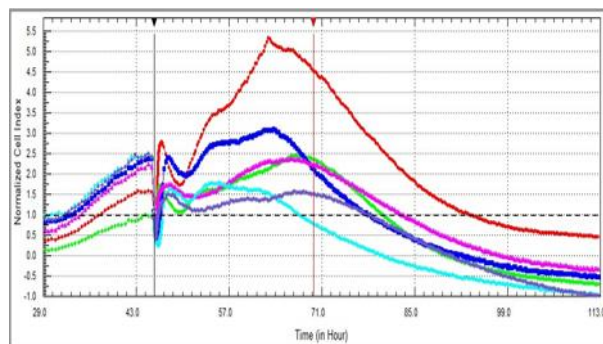
	24 h	48 h	24 h	48 h
CPt	251,94 ± 23,24	114,16 ± 0,28	451,52±53,31	237,79±2,31
Pxl	2,56 ± 0,04	1,31 ± 0,02	5,21 ± 0,20	3,69 ± 0,09
Rsv	83,82 ± 1,00	52,19 ± 0,46	166,64 ± 7,06	133,17 ± 1,36
Qct	58,97 ± 3,33	26,83 ± 5,62	136,67 ± 0,10	115,84 ± 2,61

➤ ***Analiza în timp real a activității celulelor de melanom, sub acțiunea tratamentelor individuale sau combinate***

În urma analizei efectelor administrării ca mono-tratament a agenților citostatici, CPt sau Pxl asupra celulelor de melanom, s-a constatat reducerea semnificativă a indexului celular, demonstrând inhibarea puternică a proliferării celulare, aceasta inhibare fiind direct asociată cu efectele citotoxice induse de acești compuși. Tratamentele combinate, cum ar fi CPt cu Ipi, Rsv sau Qct, au arătat o scădere a CI comparativ cu tratamentele singulare, sugerând o creștere a efectului citotoxic în raport cu efectele tratamentelor individuale. Celulele SK-MEL-24 au fost tratate când indexul celular (CI) a ajuns la valoarea 1. Linia punctată orizontală neagră reprezintă linia de referință pentru CI normalizat = 1.0. În figura 10 sunt reprezentate curbele de viabilitate ale celulelor tratate care au fost comparate cu cele înregistrate pentru celulele netratate (NT).



NT ----- ; CPt 100 mM ----- ; Ipi 20 mg/mL ----- ; Niv 20 mg/mL ----- ; CPt + Ipi ----- ; CPt + Niv -----



NT ----- ; CPt 100 mM ----- ; Rsv 50 mM ----- ; Qct 50 mM ----- ; CPt + Rsv ----- ; CPt + Qct -----

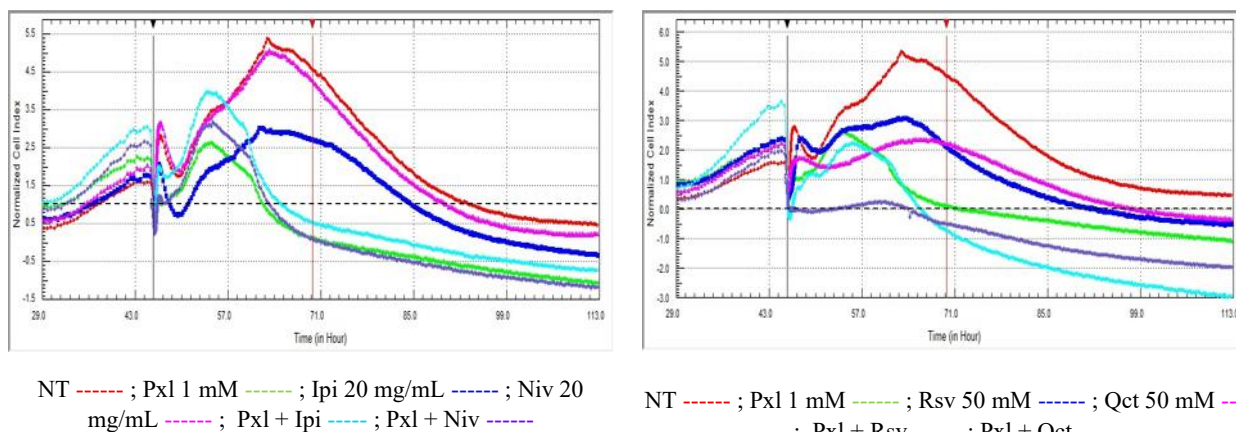


Figura 10. Monitorizarea în timp real, fără marcarea celulară, a efectelor citolitice, mediate de compuși administrați individual sau în combinații asupra celulelor de melanom uman SK-MEL-24.

➤ *Evaluarea expresiei genice asociate proceselor biologice studiate*

În figura 11 sunt prezentate grafic rezultatele modulării expresiei genice, în care se observă creșterea expresiei genei CD59 pentru fiecare compus administrat individual. Cel mai puternic efect de modulare genică s-a obținut asupra genei MDM1, care în urma administrării Rsv 50 μ M a înregistrat o multiplicare de 66,24 ori, în timp ce Qct 50 μ M a determinat o creștere de 679,25 ori a expresiei genei MDM1 față de control.

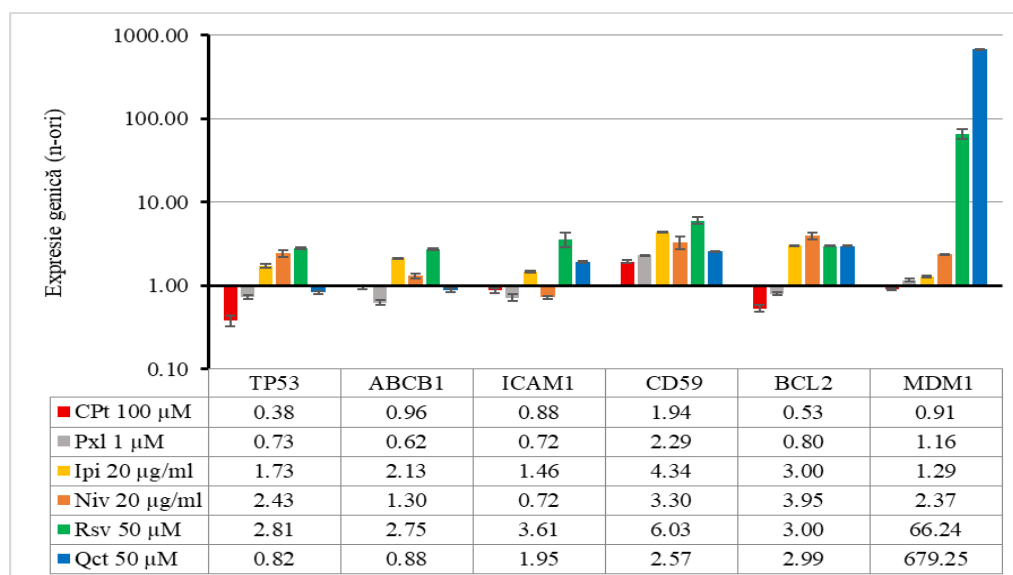


Figura 11. Analiza real-time PCR a modulării expresiei genelor TP53, BCL-2, MDM-1, ICAM-1, ABCB1 și CD59, în urma tratamentelor singulare cu agenții chimioterapeutici incluși în studiu a celulelor de melanom SK-MEL-24

Tratamentele combinate cu CPT, administrate celulelor de melanom, au determinat creșterea expresiei genice pentru TP53, ABCB1, CD59, BCL-2 și MDM1, însă o creștere semnificativă a expresiei genice a fost exercitată asupra genei MDM1 de către combinația dintre CPT și Ipi, cu o multiplicare de 372,99 de ori.

De asemenea, combinația dintre CPT și Niv a indus o creștere a expresiei genelor TP53, ABCB1, CD59, MDM1, dar și reducerea expresiei genei BCL2. Combinația dintre CPT cu Rsv a condus la efecte de modificare a expresiei genelor, de creștere, pentru ABCB1 (2,31 ori), ICAM1 (2,71 ori) și CD59 (1,86 ori), iar în cazul combinației cu Qct, creșteri ale expresiei genice s-au observat pentru ICAM1 (2,10 ori) și MDM1 (2,37 ori).

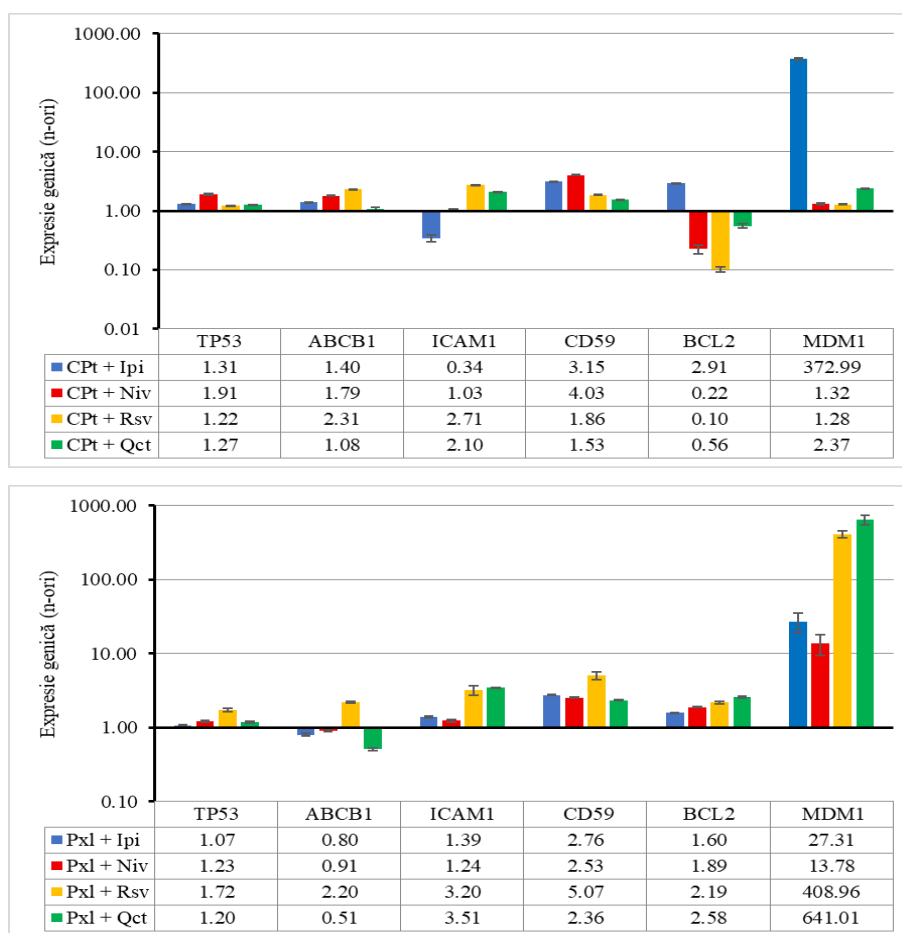


Figura 12. Analiza real-time PCR a modulării expresiei genelor TP53, BCL-2, MDM-1, ICAM-1, ABCB1 și CD59 în urma tratării celulelor de melanom SK-MEL-24 cu combinații ale CPT cu mAb sau compuși naturali

De asemenea, în urma tratamentele combinate cu Pxl, s-a constatat că cel mai puternic efect a fost cel de creștere a expresiei genei MDM1 sub acțiunea modulatorilor a combinațiilor dintre Pxl + Ipi (de 27,31 ori), Pxl + Niv (de 13,78 ori), Pxl + Rsv (de 408,96 ori) sau Pxl + Qct (de 641,01 ori).

➤ **Evaluarea modulării apoptozei în celulele de melanom SK-MEL-24**

Celulele de melanom SK-MEL-24 cultivate pentru 24 h au fost tratate cu compușii studiați, în diferite concentrații. Rezultatele au evidențiat o creștere a inducerii apoptozei timpurii în urma tratamentelor de 24 h cu un singur compus sau combinațiile compușilor testați, comparativ cu celulele netratate (Tabel 3). Efecte semnificative au fost evidențiate în cazul tratamentelor în care CPt a fost asociat cu compușii naturali bioactivi Rsv sau Qct, atingând valori ale celulelor apoptotice de până la 10,7% și, respectiv, 12,5% din celulele de melanom tratate. De asemenea, tratamentele în care Pxl s-a asociat cu Rsv sau Qct au condus la inducerea apoptozei timpurii pentru 8,9% și, respectiv, 12,9% dintre celule.

Tabel 3. Efectele apoptotice induse de tratamentele individuale sau combinate

Tratamente administrate	Evenimente apoptotice (%) ($\pm$ SD)		
	Apoptoza timpurie	Apoptoza târzie	Total evenimente
NT	3.2 $\pm$ 0.87	3.2 $\pm$ 0.54	6.4 $\pm$ 0.08
CPt (100 μ M)	11.4 $\pm$ 0.08	3.9 $\pm$ 0.87	15.3 $\pm$ 1.23
Pxl (1 μ M)	13.5 $\pm$ 0.40	6.6 $\pm$ 0.73	20.1 $\pm$ 0.79
Ipi (20 μ g/mL)	6.3 $\pm$ 0.32	2.1 $\pm$ 0.12	8.4 $\pm$ 1.86
Niv (20 μ g/mL)	8.5 $\pm$ 1.87	4.3 $\pm$ 0.84	12.8 $\pm$ 0.09
Rsv (50 μ M)	5.5 $\pm$ 0.96	6.8 $\pm$ 0.09	12.3 $\pm$ 0.51
Qct (50 μ M)	13.5 $\pm$ 0.94	8.9 $\pm$ 0.04	22.4 $\pm$ 0.89
Pxl + Ipi	5.2 $\pm$ 0.05	8.8 $\pm$ 0.32	14 $\pm$ 0.45
Pxl + Niv	9.7 $\pm$ 0.04	4.6 $\pm$ 0.71	14.3 $\pm$ 0.54
Pxl + Rsv	8.9 $\pm$ 0.73	13.2 $\pm$ 1.74	22.1 $\pm$ 2.24
Pxl + Qct	12.9 $\pm$ 1.91	10.8 $\pm$ 1.43	23.7 $\pm$ 0.96
CPt + Ipi	3.5 $\pm$ 0.54	4.6 $\pm$ 1.32	8.1 $\pm$ 0.56
CPt + Niv	3.5 $\pm$ 0.92	2.2 $\pm$ 0.04	5.7 $\pm$ 0.40
CPt + Rsv	10.7 $\pm$ 1.59	4.7 $\pm$ 0.42	15.4 $\pm$ 1.43
CPt + Qct	12.5 $\pm$ 1.34	8.8 $\pm$ 1.63	21.3 $\pm$ 1.54

➤ **Evaluarea modurii ciclului celular în celulele SK-MEL-24**

Culturile de celule tratate singular sau în combinații au prezentat scăderea distribuției celulare în faza S comparativ cu celulele de control. Tratamentele individuale cu Rsv sau Qct au indus cea mai mare descreștere a nucleilor (%) în faza S, până la 3,22% și, respectiv, 0,76%; iar în faza G0/G1 cel mai puternic efect de scădere a numărului nucleilor a fost indus de Pxl, singur sau combinat cu Ipi sau Niv (Figura 13).

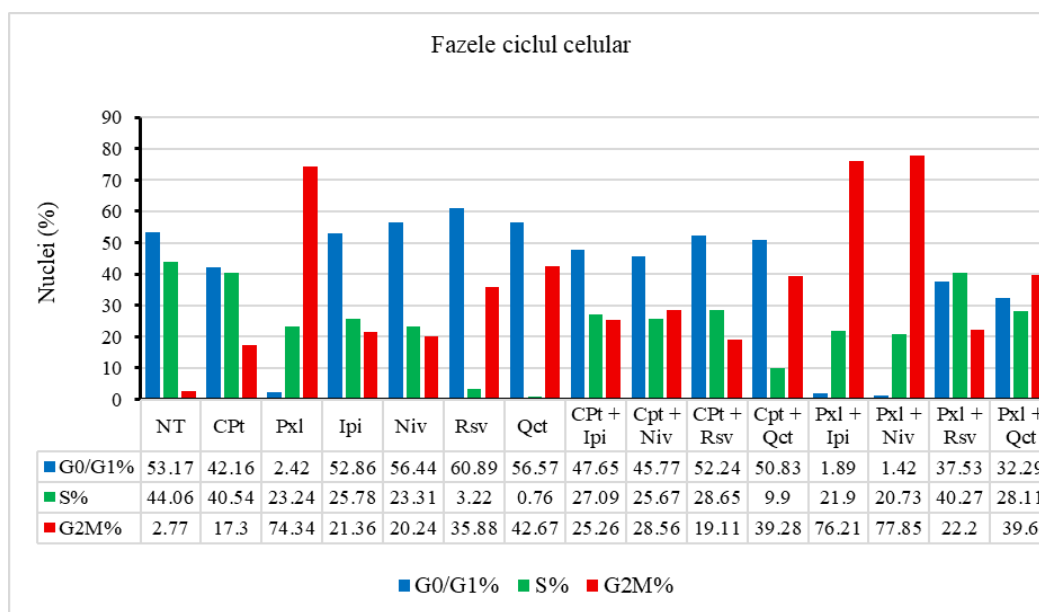


Figura 13. Modularea fazelor ciclului celular (G0/G1, S și G2M) ale celulelor de melanom uman SK-MEL-24, tratate cu compuși antineoplazici administrați individual sau în combinații

Tratamentele combinate au arătat o scădere semnificativă a nucleilor din faza S pentru combinația dintre Cpt și Qct, de până la 9,9%, în timp ce combinațiile Cpt cu Ipi, cu Niv și Rsv au indus valori ale fazei S sub 30%, de 27.09%, 25.67% și, respectiv, 28.65%, similar tratamentelor individuale. Efecte similare s-au observat pentru tratamentele combinate ale Pxl cu Ipi (21,09%), Niv (20,73%) și Qct (28,11%) (Figura 13).

Analiza statistică a posibilelor corelații dintre fazele ciclului celular și expresia genică a setului de gene menționat în secțiunea anterioară, a scos în evidență o corelație pozitivă puternic între expresia genei implicată în rezistența la terapie ABCB1 și faza G0/G1 ($r = 0,528$, $p < 0,05$) și o corelație negativă cu indicele de proliferare ($IP = S + G2M$) ($r = -0,528$, $p < 0,05$) (Figura 14).

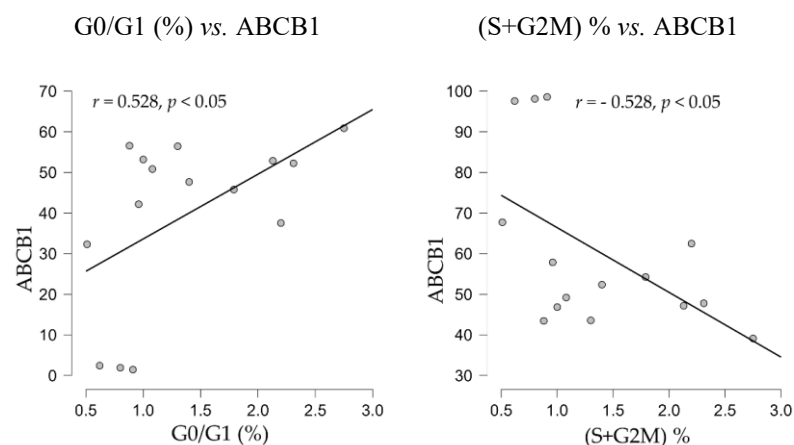


Figura 14. Corelațiile statistice dintre fazele ciclului celular și expresia genei ABCB1

➤ **Evaluarea modurii eliberării citokinelor IL-6 și TNF- α de către celulele SK-MEL-24**

Rezultatele au arătat că tratamentele combinate, în comparație cu cele individuale, au indus efecte mai puternice de modulare a producției de IL-6.

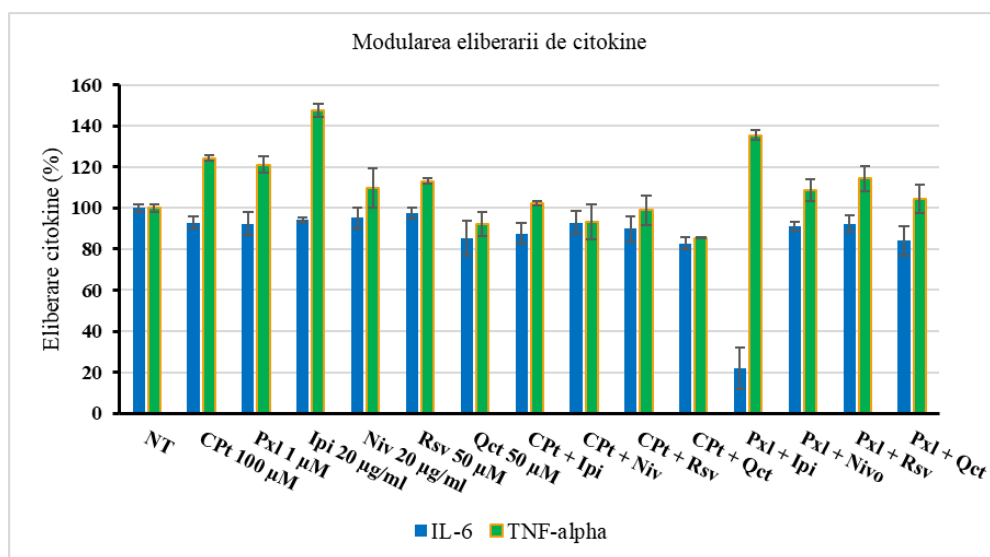


Figura 15. Evaluarea eliberării citokinelor IL-6 și TNF- α în supernatantul celulelor de cultura SK-MEL-24, tratate cu compuși administrați individual sau în combinații

Astfel, combinațiile dintre Cpt sau Pxl cu Qct au determinat o reducere a eliberării de 82,84% și 84,02%; de asemenea, combinația dintre Pxl și Ipi a determinat o scădere de 78,11% (eliberare IL-6 de 21,89%) ca reacție anti-inflamatoare. În ceea ce privește modularea eliberării citokinei TNF- α , un efect semnificativ de stimulare a eliberării TNF- α a fost înregistrat sub acțiunea anticorpului monoclonal Ipi, administrat individual sau în

este imperios necesară, având în vedere incidența în continuă creștere și rata mică de supraviețuire raportată pentru pacienții cu melanom avansat.

Pe parcursul lucrării de doctorat s-au realizat următoarele studii:

1. Un studiu retrospectiv, care a inclus 176 de pacienți (78 de femei și 98 de bărbați), diagnosticați cu melanom cutanat, aflați în diferite stadii de evoluție a bolii, pentru care au fost determinate concentrațiile de la nivel circulator a proteinelor S100B și MIA. În plus, pentru un număr de 76 de pacienți din cadrul grupului de pacienți de mai sus, a fost evaluată expresia tisulară a markerilor specifici țesutului de melanom, respectiv: S100, MelanA și HMB45. Analiza statistică a rezultatelor a permis formularea următoarelor concluzii:

- nivelul expresiei S100B și MIA solubile crește odată cu stadiul de evoluție al bolii, proteinele fiind supraexprimate în cazul pacienților cu multiple metastaze la distanță, susținând o corelație pozitivă a nivelului concentrației cu încărcarea tumorală, rezultate care sunt confirmate și de alte studii de cercetare;
- analiza coeficientul de corelație r a evidențiat o corelație directă, puternic semnificativă, între cele două proteine la pacienții din stadiile III și IV, care subliniază riscul de progresie tumorală. În stadiile I și II între cele două proteine nu s-a stabilit nici o corelație statistică.
- investigarea simultană a proteinelor S100B și MIA a demonstrat că în stadiul IV de evoluție, 81,81 % dintre pacienți au prezentat valori peste limita normală pentru cel puțin una dintre aceste proteine, iar 40,90% au avut ambele proteine cu concentrații mai mari decât limita normală, ceea ce demonstrează utilitatea evaluării concomitente a celor doi markeri în stabilirea riscului de progresie a melanomului.
- în stadiile inițiale, I și II, cel puțin una dintre cele două proteine au prezentat valori anormale pentru 22,22% și respectiv, 31,98%, procente care susțin valoarea de prognostic a proteinelor S100B și MIA solubile încă din stadiile inițiale.
- analiza potențialelor corelații dintre expresia de la nivel tisular a proteinelor S100, HMB45, MelanA și nivelul din circulație al proteinelor S100B și MIA, a arătat că expresia pozitivă tisulară a celor trei biomarkeri se corelează cu nivelurile crescute din sânge ale proteinelor S100B și MIA în stadiile III și IV.
- după excizia țesutului de melanom, s-a constatat că 11,53% dintre pacienții care au avut cei trei markeri tisulari exprimați intens pozitiv, au continuat să prezinte niveluri crescute ale concentrației proteinei S100B, indicând o posibilă invazie

tumorală sau prezența tumorilor oculte și nevoia de monitorizare frecventă, chiar dacă semnele clinice nu sunt detectabile.

- Rezultatele obținute în urma efectuării acestui studiu au fost diseminate prin publicarea lor în revista Journal of Personalized Medicine (Bolovan L.M., 2023).

2. Un studiu prospectiv, în care s-a urmărit în dinamică răspunsul imun și cel inflamator pentru un număr de 20 de pacienți diagnosticați cu MC avansat, aflați în stadiile III și IV, eligibili pentru terapia cu mAb anti-PD-1 (Nivolumab). Pentru acești pacienți s-a monitorizat variația cuantificabilă a populațiilor/ subpopulațiilor de limfocite T, limfocite B și celule NK, pe perioada tratamentului, simultan cu analiza indicatorilor inflamatori, calculați pe baza datelor obținute pentru celulele sistemului imun înnăscut (neutrofile, trombocite, monocite) și cel adaptativ (limfocite), precum și pentru citokinele pro-inflamatorii IL-6 și TNF- α . Având în vedere caracterul prospectiv al acestui studiu, rezultatele sunt preliminare și au condus la următoarele concluzii:

- pacienții cu beneficii terapeutice pe durata studiului au înregistrat creșterea progresivă a numărului celulelor NK CD16⁺56⁺ și a limfocitelor T CD8⁺citotoxice
- lotul de pacienți cu progresie tumorală pe perioada terapiei au prezentat o tendință de creștere a procentului de celulele NK în 50% dintre cazuri.
- limfocitele B CD19⁺ au evidențiat o tendință de scădere odată cu creșterea numărului de cicluri de tratament, tendință care s-a păstrat în limite normale
- procentul limfocitelor B CD19⁺ s-a corelat negativ cu procentul celulelor NK; astfel, scăderea procentului de limfocite B este compensată de creșterea procentului de celule NK, odată cu creșterea perioadei de administrare a terapiei.
- raportul CD4⁺/CD8⁺ a fost sub valoarea minimă normală pentru un procent de 35% dintre pacienți la momentul inițierii studiului, iar 75% dintre aceștia au avut evoluție nefavorabilă. Acest biomarker are valoare exploratorie, iar datele de literatură nu arată o evoluție uniformă a raportului CD4⁺/CD8⁺.
- analiza corelațiilor statistice a arătat că nivelul scăzut al limfocitelor B CD19⁺ a fost asociat cu valorile crescute ale indicilor SIRI și SII, ceea ce sugerează un răspuns nefavorabil la terapie și prezența inflamației sistemice, care contribuie la scăderea ratei de supraviețuire
- corelația pozitivă, puternic semnificativă dintre SIRI și SII sugerează, în cazul valorilor ridicate, un răspuns redus la terapia imună și un prognostic nefavorabil.

- celulele NK nu au stabilit nici o relație de asociere cu biomarkerii inflamatori analizați, ceea ce poate conduce la susținerea valorii sale de factor independent de prognostic.
- eliberarea citokinelor IL-6 s-a redus pe perioada terapiei cu Nivolumab, ceea ce demonstrează o creștere a eficienței terapiei prin scăderea acțiunii pro-inflamatorii exercitată de IL-6 atunci când este peste limite normale. TNF- α s-a menținut în limite normale, sugerând un prognostic favorabil al răspunsului la terapie.
- variația expresiei populațiilor limfocitare pe parcursul terapiei cu Nivolumab pentru pacienți cu MC poate reprezenta o sursă importantă de orientare terapeutică în cazul instalării imunosupresiei celulare sau a rezistenței la tratament, însă rezultatele obținute sunt relative, și prin urmare sunt necesare investigații pe grupuri mai mari de pacienți.
- markerii inflamatori SIRI, SII, NLR, PLR, MLR integrează celulele sistemului imun înnăscut și adaptativ, iar corelațiile dintre acești parametri ar putea reflecta răspunsul imun acut, orientat în direcția stimulării procesului inflamator ca proces care facilitează progresia tumorală și rezistența la imunoterapie a melanomului cutanat avansat.
 - Rezultatele obținute în urma efectuării acestui studiu au fost diseminate prin publicarea lor în revista Biomedicines (Bolovan L.M., 2025).

3. Un studiu experimental *in vitro*, care s-a realizat pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24, pe care s-a testat potențialul oncolitic al unui panel de compuși cu acțiune anti-tumorală, precum CPt, Pxl, Niv, Ipi, Rsv sau Qct, cu evidențierea impactului acestor tratamente asupra proceselor de diviziune celulară, proliferare, apoptoză și modificărilor moleculare induse la nivelul unor gene implicate în progresia tumorală. Rezultatele au condus la următoarele concluzii:

- citotoxicitatea celulară indusă a variat într-un mod dependent de doză și durata administrării compușilor, astfel că efectele asupra celulelor de melanom în cultură au fost mai mari în urma administrării lor timp de 48 h comparativ cu efectele obținute în urma administrării timp de 24 h.
- pentru compușii citostatici Pxl și CPt, în urma administrării individuale, s-a constatat că Pxl a indus o scădere mai mare a viabilității celulelor de melanom comparativ cu CPt, pentru toate concentrațiile.

- pentru compușii bioactivi Qct și Rsv, administrați individual, s-a observat că cel mai puternic efect de reducere a viabilității a fost indus de Qct, însă ambii au determinat scăderea viabilității până la 80% în celulele tratate, chiar și la cele mai mici concentrații aplicate.
- tratamentele individuale cu mAb Ipi și Niv au evidențiat efecte similare între ele.
- în urma tratamentelor combinate s-a evidențiat că Pxl, aplicat fie împreună cu Ipi sau Niv, ori cu Rsv sau Qct, a determinat cea mai mare scădere a CI în testul RTCA, ceea ce sugerează o acțiune puternică de inhibare a proliferării celulare.
- asocierea dintre citostaticul Pxl cu compușii bioactivi Rsv sau Qct a indus cele mai multe evenimente apoptotice în celulele de melanom SK-MEL-24, iar în urma administrării tratamentelor individuale, efectele apoptotice cele mai puternice au fost induse de tratamentul cu Pxl sau Qct.
- Pxl, singur sau combinat cu Ipi sau Niv, a indus cel mai puternic efect de scădere a numărului nucleilor din G0/G1, concomitent cu creșterea procentelor celulelor din faza G2M.
- efectele induse de combinațiile dintre agenții citostatici CPt sau Pxl cu mAb Ipi sau Niv au confirmat ca asocierea dintre capacitatea de lezare a ADN de către agenții citotoxici este potențată de prezenta mAb, care, deși nu au efecte citotoxice directe asupra celulelor tumorale, contribuie la accentuarea efectului citostatic prin inducerea *in vitro* a stresului celular nespecific asupra culturii celulelor tumorale, determinând reducerea procentului celulelor din faza S, reflectând scăderea replicării ADN și oprirea proliferării celulare.
- efectele exercitate de CPt, Pxl, Qct, Rsv, Ipi și Niv, administrați individual sau combinați, asupra expresiei genelor TP53, BCL-2, MDM-1, ICAM-1, ABCB1, CD59, au influențat în mod deosebit inducerea supraexpresiei genei MDM1. Astfel, expresia acestei gene a crescut semnificativ în urma aplicării următoarelor tratamente singulare sau combinate: Qct (679,25 de ori), Pxl + Qct (641,01 ori), Pxl + Rsv (408,96 de ori) sau CPt + Ipi (372,99 de ori). Aceste date demonstrează că supraexpresia MDM1 induce o creștere a stresului mitotic, stimulând expresia proteinei p53 și inițierea procesului de apoptoză.
 - Rezultatele obținute în urma efectuării acestui studiu au fost diseminate prin publicarea lor în revista Applied Sciences (Bolovan L.M., 2025).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Arnold, M.; Singh, D.; Laversanne, M.; Vignat, J.; Vaccarella, S.; Meheus, F.; Cust, A.E.; de Vries, E.; Whiteman, D.C.; Bray, F., 2022. *Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040*. JAMA Dermatology, 158(5), 495–503.
2. Borst, J.; Busselaar, J.; Bosma, D.M.T.; Ossendorp, F., 2021. *Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy*. European Journal of Immunology., 51(8),1911-1920.
3. Boutros, A.; Croce, E.; Ferrari, M.; Gili, R.; Massaro, G.; Marconcini, R.; Arecco, L.; Tanda, E.T.; Spagnolo, F., 2024. *The treatment of advanced melanoma: Current approaches and new challenges*. Critical. Reviews in Oncology/Hematology, 196, e104276.
4. Gao, M.; Shi, J.; Xiao, X.; Yao, Y.; Chen, X.; Wang, B.; Zhang, J., 2024. *PD-1 regulation in immune homeostasis and immunotherapy*. Cancer Letter, 588, 216726.
5. Garbe, C.; Amaral, T.; Peris, K.; Hauschild, A.; Arenberger, P.; Basset-Seguin, N.; Bastholt, L.; Bataille, V.; Brochez, L.; del Marmol, V.; et al., 2025. *European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment—Update 2024*. European Journal Cancer, 215, 115153.
6. Hoinoiu, T.; Dumitrascu, V.; Pit, D.; Schipor, D.A.; Jabri-Tabrizi, M.; Hoinoiu, B.; Petreuş, D.E.; Seiman, C., 2025. *Quercetin as a Potential Therapeutic Agent for Malignant Melanoma-A Review of Current Evidence and Future Directions*. Medicina (Kaunas), 61(4), 656.
7. Machiraju, D.; Schafer, S.; Hassel, J.C., 2021. *Potential reasons for unresponsiveness to anti-PD1 immunotherapy in young patients with advanced melanoma*. Life, 11(12), 1318.
8. Neagu, M.; Constantin, C.; Zurac, S., 2013. *Immune Parameters in The Prognosis and Therapy Monitoring of Cutaneous Melanoma Patients: Experience, Role, and Limitations*. BioMed Research International, 2013, 107940.
9. Nersesian, S.; Schwartz, S.L.; Grantham, S.R.; MacLean, L.K.; Lee, .SN.; Pugh-Toole, M.; Boudreau, .JE., 2021. *NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis*. Clinical and Translational Oncology, 14, 100930.

10. Niles, R.M.; McFarland, M.; Weimer, M.B.; Redkar, A.; Fu, Y.M.; Meadows, G.G., 2003. *Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells*. Cancer Letter, 190(2), 157-63.
11. Prkačin, I.; Mokos, M.; Ferara, N.; Šitum, M., 2024. *Melanoma's New Frontier: Exploring the Latest Advances in Blood-Based Biomarkers for Melanoma*. Cancers, 16(24), 4219.
12. Ravindranathan, D.; Master, V.A.; Bilen, M.A., 2021. *Inflammatory Markers in Cancer Immunotherapy*. Biology (Basel), 10(4), 325.
13. Reyes-Farias, M.; Carrasco-Pozo, C., 2019. *The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism*. International Journal of Molecular Sciences, 20(13), 3177.
14. Seretis, K.; Sfaelos, K.; Boptsi, E.; Gaitanis, G.; Bassukas, I.D., 2024. *The neutrophil-to-lymphocyte ratio as a biomarker in cutaneous oncology: a systematic review of evidence beyond malignant melanoma*. Cancers (Basel), 16(5), 1044.
15. Singh, P.; Ali, .SA., 2022. *Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update*. Cells. 11(15), 2274.
16. Soler, M.F.; Abaurrea, A.; Azcoaga, P.; Araujo, A.M.; Caffarel, M.M., 2023. *New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 11, e007530.
17. Thornton, J.; Chhabra, G.; Singh, C.K.; Guzman-Perez, G.; Shirley, C.A.; Ahmad, N., 2022. *Mechanisms of immunotherapy resistance in cutaneous melanoma: Recognizing a shapeshifter*. Frontiers in Oncology, 12, 880876.
18. Waseh, S.; Lee, J.B., 2023. *Advances in melanoma: Epidemiology, diagnosis, and prognosis*. Frontiers in Medicine, 10, 1268479.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Publicații cotate ISI – autor principal

1. **Bolovan, L.M.**; Panait, M.E.; Mihaila, M.; Busca, A.; Stanciu, A.E.; Bostan, M.; Brașoveanu, L.I.; Hotnog, C.M., 2025. *Modulation of the Therapeutic Resistance in SK-MEL-24 Human Melanoma Cells by Combined Treatments*. *Applied Science*, 15(19), 10703. IF = 2.5. Citescore 5.5. <https://doi.org/10.3390/app151910703>.
2. **Bolovan, L.M.**; Panait, M.E.; Busca, A.; Stanciu, A.E.; Chiriac, D.; Mihalcea, C.E.; Hotnog, C.M.; Georgescu, M.T.; Voinea, S.C.; Prunoiu, V.M.; Brașoveanu, L.I.; Gales, L.N., 2025. *Variation in Immune and Inflammatory Blood Markers in Advanced Melanoma Patients Treated with PD-1 Inhibitors: A Preliminary Exploratory Study*. *Biomedicines*, 13(6), 1378. IF = 3.9. Citescore 6.8. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13061378>
3. **Bolovan, L.M.**; Ceausu, M.; Stanciu, A.E.; Panait, M.E.; Busca, A.; Hotnog, C.M.; Bleotu, C.; Gales, L.N.; Georgescu, M.T.; Prunoiu, V.M.; Brașoveanu, L.I.; Voinea, S.C., 2023. *Correlation Studies between S100 Protein Level and Soluble MIA or Tissue MelanA and gp100 (HMB45) Expression in Cutaneous Melanoma*. *Journal of Personalized Medicine*, 13(6), 898. IF = 3.508. Citescore 6.0. <https://doi.org/10.3390/jpm13060898>.

Publicații cotate ISI - co-autor

1. Stanciu, A.E.; **Bolovan, M.L.**; Zamfir-Chiru-Anton, A.; Voiosu, C.; Dabla, P.K.; Stanciu, M.M.; Serdarevic, N.; Gherghe, M., 2025. *The Interplay Between High Cumulative Doses of Radioactive Iodine and Type 2 Diabetes Mellitus: A Complex Cardiovascular Challenge*. *International Journal of Molecular Sciences*. 26(1), 37. IF = 4.9. Citescore 9.0. <https://doi.org/10.3390/ijms26010037>.

Publicații indexate BDI – autor principal

1. Panait, M.E.; Busca, A.; Coman, A.M.; Saulea, M.; **Bolovan, L.M.**, 2021. *Prognostic value of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with solid cancers: a retrospective study*. *Archives of the Balkan Medical Union*, 56, 4, 11-19. CiteScore 0.8. Impact score 2.05. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.4.08>