
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Factori prognostici și predictivi în imunoterapia tumorilor solide

Doctorand: **Alina Miruna GRECEA**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Tudor Eliade CIULEANU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE.....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	3
1. Generalități	5
1.2 Raționamentul imunoterapiei – De la fundament istoric la aprobarea clinică	
6	
2. Biomarkeri ai răspunsului la imunoterapie – calea către imunoterapia personalizată	11
3. Biomarkeri utilizați în practica curentă	13
3.1 Expresia PD-L1 ca biomarker predictiv în imunoterapia oncologică	13
3.1.1 Rolul biologic al PD-L1 și implicații terapeutice	13
3.1.2 Dovezi clinice privind valoarea predictivă a PD-L1	13
3.1.3 Limitări și provocări legate de utilizarea PD-L1	14
3.1.4 Metode de detecție și cuantificare a expresiei PD-L1	14
3.1.5 Concluzii	15
3.2 Statusul MSI și dMMR	15
3.2.1 Fundamente biologice și mecanisme moleculare	15
3.2.2 Dovezi clinice și aprobări terapeutice	15
3.2.3 Epidemiologie și implicații clinice	16
3.2.4 Limitări și direcții viitoare	17
4. Biomarkeri emergenți – în curs de validare	19
4.1 Încărcătura mutațională tumorală - TMB	19
4.2 Limfocitele infiltrante tumorale (TILs) și structuri limfoide terțiare (TLSs)	20
4.3 Microbiomul	21
4.4 Inflamația sistemică și scorurile imune sangvine	23
4.5 Mutațiile de tip „proofreading” ale genelor POLE/POLD1 și relevanța lor în imunoterapie	24
4.6 Semnături genomice ca biomarkeri regulatori ai imunității	25
4.7 Biomarkeri de rezistență la imunoterapie	27
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	29
5. Scop și obiective	31
6. Metodologia generală	33

7. Studiul 1. Rolul TNF- α , IL-10 și IL-2 ca biomarkeri predictivi ai răspunsului la imunoterapie 35

- 7.1 Introducere 35
- 7.2 Obiective 36
- 7.3 Materiale și metode 36
- 7.4 Rezultate 38
- 7.5 Discuții 48
- 7.6 Concluzii 52

8. Studiul 2. Interacțiunea dintre celulele imune și citokine în NSCLC și melanom: un studiu longitudinal al dinamicii biomarkerilor 53

- 8.1 Introducere 53
- 8.2 Materiale și metode 55
- 8.3 Rezultate 56
- 8.4 Discuții 68
- 8.5 Concluzii 72

9. Studiul 3 - Studiu experimental in vitro – modele de co-cultură predictive 73

- 9.1 Introducere 73
- 9.2 Materiale și metode 74
- 9.3 Rezultate 78
- 9.4 Discuții 86
- 9.5 Concluzii 89

10. Concluzii generale 91**11. Originalitatea studiilor și contribuțiile aduse** 93**REFERINȚE**..... 99**Cuvinte cheie:** PD-L1, NSCLC, melanom, IL-2, TNF- α , IL-2, biomarkeri, ICI

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Grecea, M., Soritau, O., Dulf, D., Ciuleanu, T. E., & Zdrenghea, M. (2021). Potential Biomarkers for the Efficacy of PD-1-PD-L Blockade in Cancer. *OncoTargets and therapy*, 14, 5275–5291. <https://doi.org/10.2147/OTT.S283892>,
ISI, factor de impact 2.8 (studiu cuprins în capitolul 2).
2. Grecea-Balaj, A. M., Soritau, O., Brie, I., Perde-Schrepler, M., Virág, P., Todor, N., Ciuleanu, T. E., & Cismaru, C. A. (2025). Immune Cell–Cytokine Interplay in NSCLC and Melanoma: A Pilot Longitudinal Study of Dynamic Biomarker Interactions. *Immuno*, 5(3), 29. <https://doi.org/10.3390/immuno5030029>
ISI, factor de impact 2.5 (studiu cuprins în capitolul 8, partea discuții)
3. Grecea-Balaj, A. M., Soritau, O., Brie, I., Perde-Schrepler, M., Virag, P., Fischer-Fodor, E., Todor, N., Cenariu, M., Nedelea, I., & Ciuleanu, T. E. (2025). Serum TNF - α , IL-10 and IL-2 Trajectories and Outcomes in NSCLC and Melanoma Under Anti-PD-1 Therapy: Longitudinal Real-World Evidence from a Single Center. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(9), 746. <https://doi.org/10.3390/cimb47090746>
ISI, factor de impact 3.0 (studiu cuprins în capitolul 7)

INTRODUCERE

În ultimul deceniu, imunoterapia prin inhibitorii punctelor de control imun a schimbat fundamental paradigma terapeutică în oncologie, aducând beneficii semnificative pacienților cu melanom malign și cancer pulmonar non-microcelular (NSCLC) avansat. Totuși, răspunsul favorabil la tratament este obținut doar de o parte dintre pacienți, iar evoluția clinică rămâne extrem de heterogenă. În lipsa unor criterii de stratificare clare, selecția candidaților pentru imunoterapie continuă să se bazeze pe parametri nespecfici și validați insuficient. În acest context, identificarea unor biomarkeri predictivi și prognostici capabili să anticipeze eficacitatea tratamentului și să reflecte evoluția bolii devine o prioritate esențială pentru personalizarea terapiei oncologice. Biomarkerii dinamici, analizați longitudinal, precum și integrarea markerilor serici și celulari, oferă oportunitatea de a surprinde mecanisme subtile de răspuns sau rezistență la imunoterapie, cu impact direct asupra deciziilor clinice și asupra îmbunătățirii rezultatelor terapeutice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Biomarkerii utilizați în practica clinică actuală includ expresia PD-L1, considerată unul dintre cei mai importanți predictorii, deși cu valoare predictivă variabilă în funcție de tipul tumoral și metodele de cuantificare. Sistemele validate clinic, cum ar fi TPS pentru NSCLC, CPS pentru cancerul gastric și esofagian, și IC pentru TNBC și carcinomul urotelial, oferă instrumente standardizate pentru evaluare, însă heterogenitatea intratumorală și varietatea testelor imunohistochimice complică implementarea uniformă.

Statusul MSI-H/dMMR reprezintă cel mai robust biomarker validat clinic, conferind prima aprobare tisular-independentă a unei terapii oncologice. Tumorile cu deficiență în sistemul de reparare a nepotrivilor prezintă o încărcătură mutațională ridicată și o imunogenitate crescută, traducându-se în rate de răspuns de 40-78% la inhibitorii PD-1.

Biomarkerii emergenți în curs de validare oferă perspective promițătoare pentru extinderea capacității de predicție. Încărcătura mutațională tumorală reflectă potențialul imunogenic prin numărul de neoantigene și s-a asociat consistent cu răspuns clinic îmbunătățit în melanom, NSCLC și carcinom urotelial, deși standardizarea rămâne o provocare datorită variabilității pragurilor de cut-off și diferențelor între platformele de secvențiere.

Limfocitele infiltrante tumorale și structurile limfoide terțiare reprezintă markeri ai micromediului tumoral inflammat, asociați cu prognostic favorabil și răspuns crescut la imunoterapie. Tehnologiile digitale bazate pe învățare automată permit acum cuantificarea obiectivă și reproductibilă a acestor parametri, depășind limitările evaluării manuale și oferind stratificare superioară comparativ cu biomarkerii tradiționali.

Microbiomul intestinal a emergit ca factor imunomodulator major, cu specii benefice precum *Akkermansia muciniphila* asociate cu răspuns îmbunătățit la inhibitorii punctelor de control imun. Perturbarea microbiomului prin administrarea de antibiotice cu spectru larg se corelează cu prognostic mai slab, în timp ce studiile prospective evaluează deja intervenții terapeutice precum transplantul de microbiotă fecală pentru restabilirea sensibilității la imunoterapie în cazurile refractare.

Biomarkerii inflamatori sistemici derivați din hemograma de rutină, inclusiv raportul neutrofile/limfocite, indicele inflamator sistemic și indicele imunologic pulmonar, oferă instrumente accesibile pentru stratificarea pacienților. Formele solubile ale proteinelor de checkpoint și markerii metabolici precum lactat dehidrogenaza completează tabloul evaluării sistemice a statusului imun.

Mutațiile în genele *POLE* și *POLD1* localizate în domeniul exonucleazic generează un fenotip ultramutator cu sensibilitate crescută la inhibitorii PD-1/PD-L1, reprezentând un biomarker emergent cu potențial clinic semnificativ, în special în cancerul endometrial și colorectal. Semnăturile genomice, inclusiv profilurile de expresie genică legate de interferon gamma, mutațiile asociate cu expunerea la factori mutageni externi și semnăturile mutaționale specifice, contribuie la înțelegerea mecanismelor moleculare care determină răspunsul la imunoterapie.

Identificarea biomarkerilor de rezistență devine esențială pentru optimizarea strategiilor terapeutice, incluzând pierderea prezentării antigenice prin mutații B2M, supraproducția moleculelor alternative de checkpoint și infiltratul cu celule imunosupresive în micromediul tumoral. Aceste mecanisme deschid perspective pentru dezvoltarea combinațiilor terapeutice inovatoare menite să extindă beneficiile imunoterapiei la un număr mai mare de pacienți.

Viitorul biomarkerilor în imunoterapia oncologică se orientează către modele predictive integrative care combină parametri tisulari, sistemici și microbiomici în abordări multimodale robuste. Tehnologiile multi-omice spațiale și transcriptomica spațială avansată permit cartografierea precisă a interacțiunilor celulare în micromediul tumoral, în timp ce inteligența artificială facilitează dezvoltarea algoritmilor predictivi superiori biomarkerilor individuali actuali, promițând optimizarea selecției pacienților și extinderea beneficiilor terapeutice în era medicinei personalizate.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Rolul TNF- α , IL-10 și IL-2 ca biomarkeri predictivi ai răspunsului la imunoterapie

Scop / Obiective: Monitorizarea longitudinală a citokinelor pentru a evalua dinamic eficacitatea tratamentului imunoterapic și tiparele de reconstituire imună

Material și metode: Studiu clinic intervențional, prospectiv, monocentric, realizat la Institutul Oncologic „Prof. Dr. I. Chiricuță” din Cluj-Napoca, România, între ianuarie 2018 și ianuarie 2020 pe 58 de pacienți. Urmărirea a fost longitudinală, iar o ultimă actualizare a datelor de supraviețuire a fost în mai 2025

Rezultate: Analiza longitudinală a arătat că nivelurile bazale și dinamica IL-2 se corelează cu supraviețuirea globală, iar creșterile precoce ale IL-10 și TNF- α pot anticipa beneficiul clinic

Concluzii: Fezabilitatea monitorizării dinamice și integrate a biomarkerilor imunologici în practică clinică cu noi corelații între evoluția unor markeri cost eficienți și răspunsul la imunoterapie

Studiul 2. Interacțiunea dintre celulele imune și citokine în NSCLC și melanom: un studiu longitudinal al dinamicii biomarkerilor

Scop / Obiective: 1. evaluarea modificărilor dinamice din micromediul tumoral (TME) prin analiza populațiilor de limfocite activate din sângele periferic, înainte și după terapie cu Nivolumab, cu scopul de a evidenția natura răspunsului imun.

2. determinarea posibilității ca anumite citokine inflamatorii să servească drept biomarkeri predictivi ai răspunsului la imunoterapie, cu valoare prognostică în raport cu supraviețuirea.

3. investigarea corelației dintre răspunsurile imune celulare și cele umorale la pacienții diagnosticați cu NSCLC și melanom.

Material și metode: Pe același lot de 58 de pacienți cu melanom și NSCLC în curs de tratament cu Nivolumab s-a realizat imunofenotiparea a limfocitelor din sângele periferic la intervale fixe de timp (baseline, 3 și 6 luni de la inițierea imunoterapiei), evaluându-se markeri imunologici precum expresia receptorilor de suprafață PD-1,

CD95 (receptor Fas), populațiile de limfocite T CD8⁺ și CTLA-4. De asemenea, au fost calculate rapoarte de coexpresie: PD-1/CD95 și CD8/CTLA-4.

Rezultate: NSCLC și melanom au afișat tipare divergente în ceea ce privește imunofenotiparea: la pacienții cu NSCLC s-au observat variații individuale mari (spre exemplu expresia PD-1 cu episoade extreme), pe când la melanom modificările markerilor au fost mai uniforme și atenuate, sugerând mecanisme de rezistență și reglare imună distincte între cele două malignități.

Concluzii: Rezultatele converg către ideea că profilarea longitudinală a citokinelor și a fenotipului imun poate anticipa cursul tratamentului cu ICI, permițând identificarea timpurie a non-responderilor și personalizarea strategiei terapeutice.

Studiul 3. Studiu experimental in vitro – modele de co-cultură predictive

Scop / Obiective: Explorarea mecanismelor celulare și moleculare care stau la baza răspunsului combinat radio-imunoterapie, utilizând modele experimentale de co-cultură ce includ linii celulare tumorale (A549 pentru NSCLC și SK-Mel pentru melanom) și celule imune izolate din sângele periferic

Material și metode: Experiment in vitro, cu caracter translațional, desfășurat în laboratorul de biologie tumorală și radiobiologie al institutului (septembrie 2019 – ianuarie 2020). S-au folosit modele de co-cultură într-un sistem transwell, menite să imite dialogul tumoral-imun în prezența diferitelor tratamente. În aceste experimente, celulele imune și cele tumorale au fost cultivate fără contact direct (separate printr-o membrană poroasă de 0,4 μm), permițând însă schimbul de factori solubili (citokine, chemokine) între compartimente.

Au fost investigate două linii celulare tumorale reprezentative, A549 (carcinom pulmonar non-microcelular) și SK-Mel-28 (melanom), cultivate în condiții standard și supuse fie radioterapiei (o doză unică de 4 Gy), fie menținute ca martor. În paralel, s-au folosit celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) provenite de la donatori sănătoși, fie ca populație mixtă, fie îmbogățite pentru limfocite T CD8⁺. Celulele imune au fost tratate sau nu cu Nivolumab, pentru a simula blocada PD-1, și au fost apoi co-cultivate cu celulele tumorale iradiate sau neiradiate.

Acest design a generat patru condiții experimentale principale: martor (fără tratament), doar imunoterapie (Nivolumab), doar radioterapie și combinația radio-imunoterapie. Co-culturile au fost menținute în incubator, iar probele au fost recoltate la 4 și 24 de ore pentru a surprinde atât efectele imediate, cât și pe cele tardive ale tratamentului.

Analizele ulterioare au vizat: determinarea nivelurilor de citokine (IL-2, IL-10, TNF-α) din mediul de cultură prin ELISA, evaluarea apoptozei celulelor tumorale prin citometrie

în flux și microscopia de fluorescență, precum și analiza expresiei markerilor de checkpoint imun (PD-1, PD-L1) atât pe celulele tumorale, cât și pe cele imune.

Rezultate: Datele sugerează că radio-imunoterapia determină atât o inducere robustă a apoptozei tumorale, cât și o remodelare a microambientului imun, prin creșterea expresiei PD-L1 și modularea secreției citokinice, efecte care depind de tipul tumoral și de interacțiunea cu celulele imune.

Concluzii: Contribuția principală a studiului constă în demonstrarea integrată, pe același set experimental, a acestei secvențe funcționale: primare prin radioterapie și rafinare prin anti-PD-1 în paralel pe trei dimensiuni măsurabile (apoptoză, PD-L1, citokine) și în două tipuri tumorale cu biologie distinctă. Designul transwell fără contact a izolat clar cros-talk-ul solubil, explicând de ce efectele co-culturii devin mai vizibile la 24 de ore, interval necesar acumulării mediatorilor secretați în supernatanți. În plus, diferențele dintre A549 și SK-Mel subliniază importanța contextului tumoral în proiectarea strategiilor combinate, sugerând că melanomul are nevoie mai frecvent de sinergia cu imunitatea pentru a converti stresul genotoxic în moarte celulară relevantă biologic.

CONCLUZII GENERALE

Cele trei studii incluse în această teză, reunind analize clinice prospective și investigații experimentale, a evidențiat rolul critic al profilului imun în predicția răspunsului la imunoterapia tumorilor solide. Cercetările au demonstrat că pacienții cu melanom și cei cu cancer pulmonar non-microcelular (NSCLC) prezintă dinamici imunologice distincte sub tratament anti-PD-1, reflectând diferențe fundamentale între aceste tipuri de tumori. Melanomul, recunoscut ca tumoră imunogenă, a fost asociat cu răspunsuri pro-inflamatorii mai viguroase, concretizate prin creșteri susținute ale citokinelor IL-2 și TNF- α , în timp ce NSCLC a manifestat pattern-uri mai heterogene și adesea atenuate ale activării imune. Aceste observații clinice esențiale sugerează existența unor micromedii tumorale pre-stimulate diferit: pacienții cu melanom au intrat în terapie cu un tonus imun inflamator mai ridicat (de exemplu, niveluri bazale mai mari de TNF- α și IL-10), ceea ce pare să favorizeze mobilizarea sistemului imun sub blocada PD-1, pe când la NSCLC răspunsul imun a variat mai mult, posibil din cauza complexității microambientului tumoral și a variabilității expresiei țintelor imune.

Importanța profilării dinamice a biomarkerilor, atât a citokinelor serice (IL-2, IL-10, TNF- α), cât și a markerilor celulari de pe limfocite (PD-1, CTLA-4, CD95), a fost ferm subliniată de rezultatele obținute. Monitorizarea longitudinală a acestor indicatori, la intervale cheie după inițierea imunoterapiei, a permis surprinderea remodelării imune pe parcursul tratamentului și identificarea timpurie a unor semnale predictive.

Creșterile post-terapeutice ale IL-2 și TNF- α s-au dovedit deosebit de relevante prognostic, în mod special nivelul IL-2 măsurat la trei luni de terapie s-a concretizat ca un predictor timpuriu robust al supraviețuirii, iar valorile crescute ale TNF- α s-au corelat pozitiv cu evoluția clinică favorabilă, un rezultat notabil, având în vedere rolul ambivalent al acestei citokine în oncogeneză. Pe de altă parte, IL-10 nu a arătat o legătură consistentă cu prognosticul în cohortele studiate, în pofida variațiilor sale dramatice la unii pacienți cu melanom, sugerând că efectele sale rămân dependente de context și pot fi mascate de alte mecanisme reglatoare. De asemenea, markerii de checkpoint evaluați pe limfocitele circulante (raportul PD-1/CD95, proporția celulelor T CTLA-4⁺ etc.) au prezentat o variabilitate inter-individuală semnificativă, fără corelații robuste cu supraviețuirea sau cu profilurile citokinice. Această constatare indică faptul că expresia izolată a acestor receptori imuni pe celulele periferice nu constituie un indicator suficient al răspunsului terapeutic în absența contextului funcțional, evidențiind necesitatea validării suplimentare a utilității lor în studii mai ample.

Relevanța clinică a biomarkerilor analizați transpare din posibilitatea integrării lor în ghidarea terapeutică. De exemplu, un profil imun pro-inflamator inițial (precum un nivel crescut de TNF- α înainte de tratament) și amplificarea timpurie a citokinelor favorabile (IL-2, TNF- α) sub imunoterapie ar putea semnala pacienții cu probabilitate mai mare de beneficii clinice durabile, permițând stratificarea acestora pentru un management optim. Totodată, absența sau inversarea acestor dinamici ar putea indica rezistență primară sau secundară, sugerând necesitatea adaptării strategiei terapeutice (de pildă, asocierea altor intervenții). Astfel, monitorizarea în timp real a răspunsului imun devine un instrument promițător pentru personalizarea imunoterapiei, prin ajustarea tratamentului în funcție de profilul biomarkerilor fiecărui pacient.

În pofida acestor contribuții științifice, limitările studiilor impun prudență în interpretare. Dimensiunea relativ redusă a cohortelor investigate, precum și pierderea unor pacienți la urmărirea longitudinală (din cauza evoluției nefavorabile) pot reduce puterea statistică. Cu toate acestea, tiparele clare observate, diferențele imunologice între NSCLC și melanom, rolul benefic al unei imunități activate susținut, respectiv lipsa de impact a unor anumiți biomarkeri statici, oferă o direcție solidă pentru cercetările ulterioare.

Viitorul în acest domeniu trebuie să includă studii prospective cu loturi mai mari și heterogene, ideal multicentrice, pentru a valida robustețea acestor biomarkeri ca instrumente predictive și prognostice. De asemenea, extinderea investigațiilor către terapii combinate (de exemplu, combinarea imunoterapiei cu radioterapia sau cu alți modulatori ai răspunsului imun) este justificată de indiciile mecanistice obținute, vizând potențarea sinergică a efectului antitumoral și depășirea mecanismelor de evadare

imună. Nu în ultimul rând, aprofundarea mecanismelor biologice, în special elucidarea rolurilor duale ale citokinelor cu funcții complexe precum IL-10 și TNF- α , va fi esențială pentru optimizarea viitoarelor abordări de tratament.

În concluzie, rezultatele acestei teze subliniază importanța unei profilări imune dinamice și integrate în imunoterapia cancerului, deschizând perspective pentru aplicarea clinică a biomarkerilor în ghidarea deciziilor terapeutice și pentru dezvoltarea unor strategii de tratament personalizate, adaptative, menite să îmbunătățească rezultatele pacienților și să depășească provocările rezistenței la imunoterapie.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Seria de trei studii propune o abordare inovatoare a monitorizării imunoterapiei în tumori solide, printr-un design prospectiv, longitudinal, desfășurat în practică reală. Această concepție a permis măsurarea uniformă, la momente prestabilite, a markerilor imunologici pe parcursul terapiei, captând dinamica răspunsului imun și depășind limitările analizelor transversale, retrospective. Relevanța clinică este astfel sporită, rezultatele reflectând fidel evoluțiile întâlnite în îngrijirea curentă.

O contribuție metodologică centrală este integrarea concomitentă a profilării citokinelor (IL-2, IL-10, TNF- α , prin ELISA) cu imunofenotiparea celulară (PD-1, CTLA-4, CD95, subpopulații CD8⁺, prin citometrie în flux) la aceiași pacienți și în aceleași momente. Această viziune holistică, corelând brațul umoral cu cel celular, permite investigarea relațiilor funcționale dintre mediatori și starea limfocitară sub inhibiție PD-1, demonstrând fezabilitatea biomonitorizării integrate în clinică.

Analitic, studiile valorifică modele liniare mixte și analize de corelație neparametrică (Spearman) pentru a extrage semnale robuste din seturi longitudinale, eterogene și de dimensiune redusă. Această rigoare statistică, rar aplicată sistematic în monitorizarea de rutină a imunoterapiei, a făcut posibilă detectarea de tipare temporale subtile și de asocieri monotone între biomarkeri și end-pointuri clinice.

Contribuțiile științifice includ corelații originale între dinamica biomarkerilor și eficacitatea clinică. În NSCLC, IL-10 crescută precoce sub terapie s-a asociat cu răspuns nefavorabil, propunând IL-10 drept predictor timpuriu al eșecului terapeutic. În paralel, TNF- α evaluat dinamic (în special la intervale tardive) s-a corelat cu beneficiu clinic

prelungit, sugerând rolul potențial benefic al unei inflamații controlate în medierea răspunsului antitumoral. Diferențele NSCLC vs. melanom, de la nivelurile bazale până la amplitudinea răspunsului citokinic și profilurile PD-1/CD95, evidențiază particularități imunologice specifice tumorii, susținând necesitatea algoritmilor de monitorizare adaptați pe indicație.

Pe lângă rezultate, lucrarea aduce un aport de *know-how* prin protocoale integrate de prelevare și analiză, vizualizări longitudinale, pentru a conjuga variabilitatea individuală cu tendința de grup și o infrastructură analitică (programare științifică) ușor transferabilă în studii viitoare.

În perspectivă, propun extinderea biomonitorizării dinamice prin integrarea profilării moleculare (NGS, IHC avansată) și a alterărilor cu impact clinic descoperite recent (SMARCA4, STK11, KEAP1) într-un cadru multidimensional și personalizat. Această direcție vizează rafinarea selecției și monitorizării pacienților pe imunoterapie, cu potențial de optimizare a deciziilor terapeutice și maximizare a beneficiului clinic.

INTRODUCTION

In the last decade, immunotherapy with immune checkpoint inhibitors has fundamentally changed the therapeutic paradigm in oncology, bringing significant benefits to patients with malignant melanoma and advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). However, a favorable response to treatment is achieved only in a portion of patients, and clinical outcomes remain extremely heterogeneous. In the absence of clear stratification criteria, the selection of candidates for immunotherapy continues to rely on nonspecific and insufficiently validated parameters. In this context, the identification of predictive and prognostic biomarkers capable of anticipating treatment efficacy and reflecting disease progression becomes a key priority for the personalization of oncologic therapy. Dynamic biomarkers, analyzed longitudinally, as well as the integration of serum and cellular markers, offer the opportunity to capture subtle mechanisms of response or resistance to immunotherapy, with a direct impact on clinical decision-making and on the improvement of therapeutic outcomes.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The biomarkers currently used in clinical practice include PD-L1 expression, considered one of the most important predictors, although its predictive value varies depending on tumor type and quantification methods. Clinically validated scoring systems, such as TPS for NSCLC, CPS for gastric and esophageal cancers, and IC for TNBC and urothelial carcinoma, provide standardized tools for assessment; however, intratumoral heterogeneity and the diversity of immunohistochemistry assays complicate uniform implementation.

MSI-H/dMMR status represents the most robust clinically validated biomarker, leading to the first tissue-agnostic approval of an oncologic therapy. Tumors deficient in the mismatch repair system display a high mutational burden and increased immunogenicity, translating into response rates of 40–78% to PD-1 inhibitors.

Emerging biomarkers under validation offer promising perspectives for expanding predictive capacity. Tumor mutational burden (TMB) reflects immunogenic potential through the number of neoantigens and has been consistently associated with improved clinical responses in melanoma, NSCLC, and urothelial carcinoma, though

standardization remains challenging due to variations in cut-off thresholds and differences between sequencing platforms.

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and tertiary lymphoid structures (TLSs) serve as markers of an inflamed tumor microenvironment, associated with favorable prognosis and enhanced immunotherapy response. Novel digital technologies based on machine learning now allow objective and reproducible quantification of these parameters, overcoming the limitations of manual evaluation and providing superior stratification compared to traditional biomarkers.

The gut microbiome has emerged as a major immunomodulatory factor, with beneficial species such as *Akkermansia muciniphila* associated with improved response to immune checkpoint inhibitors. Conversely, disruption of the microbiome through broad-spectrum antibiotic use correlates with poorer prognosis. Prospective studies are already investigating therapeutic interventions such as fecal microbiota transplantation as a means to restore immunotherapy sensitivity in refractory cases.

Systemic inflammatory biomarkers, derived from routine blood counts, including the neutrophil-to-lymphocyte ratio, systemic inflammatory index, and lung immune prognostic index, provide accessible tools for patient stratification. Soluble forms of checkpoint proteins and metabolic markers such as lactate dehydrogenase complement the systemic evaluation of immune status.

Mutations in *POLE* and *POLD1* genes, localized in the exonuclease domain, generate an ultramutator phenotype highly sensitive to PD-1/PD-L1 inhibitors. These represent emerging biomarkers of significant clinical potential, particularly in endometrial and colorectal cancers. Genomic signatures, including interferon gamma-related gene expression profiles, mutational patterns linked to exposure to external mutagens, and specific mutational signatures, further contribute to understanding the molecular mechanisms driving response to immunotherapy.

The identification of resistance biomarkers is becoming essential for optimizing therapeutic strategies. Mechanisms include antigen-presentation loss through B2M mutations, overproduction of alternative checkpoint molecules, and infiltration by immunosuppressive cells within the tumor microenvironment. These insights pave the way for innovative therapeutic combinations designed to expand the benefits of immunotherapy to a larger cohort of patients.

The future of biomarkers in oncologic immunotherapy points toward integrative predictive models that combine tissue, systemic, and microbiome parameters within robust multimodal approaches. Advanced spatial multi-omics technologies and spatial

transcriptomics enable precise mapping of cellular interactions within the tumor microenvironment, while artificial intelligence facilitates the development of predictive algorithms superior to current individual biomarkers, promising to optimize patient selection and extend therapeutic benefits in the era of personalized medicine.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: The Role of TNF- α , IL-10, and IL-2 as Predictive Biomarkers of Response to Immunotherapy

Purpose / Objectives: Longitudinal monitoring of cytokines to dynamically assess the effectiveness of immunotherapy and patterns of immune reconstitution.

Materials and Methods: Interventional, prospective, single-center clinical study conducted at the "Prof. Dr. I. Chiricuța" Oncology Institute in Cluj-Napoca, Romania, between January 2018 and January 2020, involving 58 patients. The follow-up was longitudinal, with the most recent update of survival data in May 2025.

Results: Longitudinal analysis showed that baseline levels and dynamics of IL-2 correlate with overall survival, while early increases in IL-10 and TNF- α can anticipate clinical benefit.

Conclusions: Dynamic and integrated monitoring of immunological biomarkers is feasible in clinical practice, with new correlations identified between the evolution of cost-effective markers and response to immunotherapy.

Study 2. Interaction Between Immune Cells and Cytokines in NSCLC and Melanoma: A Longitudinal Study of Biomarker Dynamics

Purpose / Objectives:

1. To assess dynamic changes in the tumor microenvironment (TME) by analyzing populations of activated lymphocytes from peripheral blood before and after Nivolumab therapy, in order to highlight the nature of the immune response.
2. To determine the potential for certain inflammatory cytokines to serve as predictive biomarkers of response to immunotherapy, with prognostic value in relation to survival.

3. To investigate the correlation between cellular and humoral immune responses in patients diagnosed with NSCLC and melanoma.

Materials and Methods: In the same cohort of 58 patients with melanoma and NSCLC undergoing treatment with Nivolumab, immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was conducted at fixed intervals (baseline, 3 months, and 6 months after initiation of immunotherapy), evaluating immunological markers such as surface expression of PD-1 receptors, CD95 (Fas receptor), CD8⁺ T lymphocyte populations, and CTLA-4. Co-expression ratios were also calculated: PD-1/CD95 and CD8/CTLA-4.

Results: NSCLC and melanoma displayed divergent immunophenotyping patterns: NSCLC patients showed high individual variability (for example, PD-1 expression with extreme episodes), whereas in melanoma, marker changes were more uniform and attenuated, suggesting distinct mechanisms of resistance and immune regulation between the two malignancies.

Conclusions: The findings support the idea that longitudinal profiling of cytokines and immune phenotypes can anticipate the course of treatment with immune checkpoint inhibitors (ICI), allowing for early identification of non-responders and personalization of therapeutic strategies.

Study 3. Experimental In Vitro Study – Predictive Co-culture Models

Purpose / Objectives: To explore the cellular and molecular mechanisms underlying the combined response to radioimmunotherapy, using experimental co-culture models including tumor cell lines (A549 for NSCLC and SK-Mel for melanoma) and immune cells isolated from peripheral blood.

Materials and Methods: This in vitro, translational experiment was conducted in the tumor biology and radiobiology laboratory of the institute (September 2019 – January 2020). Co-culture models were established using a transwell system designed to simulate tumor-immune dialogue in the presence of various treatments. Immune and tumor cells were cultivated without direct contact (separated by a 0.4 μm porous membrane), allowing for the exchange of soluble factors (cytokines, chemokines) between compartments.

Two representative tumor cell lines were investigated: A549 (non-small cell lung carcinoma) and SK-Mel-28 (melanoma), cultured under standard conditions and subjected either to radiotherapy (a single 4 Gy dose) or maintained as controls. In parallel, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were used,

either as mixed populations or enriched for CD8⁺ T lymphocytes. Immune cells were treated or not with Nivolumab to simulate PD-1 blockade and then co-cultured with irradiated or non-irradiated tumor cells.

This design generated four main experimental conditions: control (no treatment), immunotherapy only (Nivolumab), radiotherapy only, and combined radioimmunotherapy. Co-cultures were incubated, and samples were collected at 4 and 24 hours to capture both immediate and delayed treatment effects.

Subsequent analyses included measuring cytokine levels (IL-2, IL-10, TNF- α) in the culture medium by ELISA, assessing tumor cell apoptosis by flow cytometry and fluorescence microscopy, and analyzing the expression of immune checkpoint markers (PD-1, PD-L1) on both tumor and immune cells.

Results: Data suggest that radioimmunotherapy induces both robust tumor cell apoptosis and remodeling of the immune microenvironment, characterized by increased PD-L1 expression and changes in cytokine secretion—effects dependent on tumor type and interaction with immune cells.

Conclusions: The main contribution of this study is the integrated demonstration, within the same experimental framework, of a functional sequence: initial induction by radiotherapy and refinement by anti-PD-1 therapy, measured across three dimensions (apoptosis, PD-L1, cytokines) and in two tumor types with distinct biological characteristics. The contact-free transwell design clearly isolated soluble crosstalk, explaining why co-culture effects become more evident at 24 hours, an interval needed for the accumulation of secreted mediators in supernatants. Furthermore, differences between A549 and SK-Mel highlight the importance of tumor context in designing combination strategies, suggesting that melanoma more frequently requires synergy with immunity to convert genotoxic stress into biologically meaningful cell death.

GENERAL CONCLUSIONS

The three studies included in this thesis, bringing together prospective clinical analyses and experimental investigations, highlighted the critical role of the immune profile in predicting the response to immunotherapy in solid tumors. The research demonstrated that patients with melanoma and those with non-small cell lung cancer (NSCLC) exhibit distinct immunological dynamics under anti-PD-1 treatment, reflecting fundamental differences between these tumor types. Melanoma, recognized as an immunogenic tumor, was associated with more vigorous pro-inflammatory responses, manifested by sustained increases in IL-2 and TNF- α cytokines, whereas NSCLC showed more heterogeneous and often attenuated patterns of immune activation. These essential clinical observations suggest the existence of differently pre-stimulated tumor microenvironments: melanoma patients entered therapy with a higher baseline inflammatory immune tone (for example, higher baseline levels of TNF- α and IL-10), which appears to favor mobilization of the immune system under PD-1 blockade, while in NSCLC, the immune response was more variable, possibly due to the complexity of the tumor microenvironment and variability in immune target expression.

The importance of dynamic profiling of biomarkers, including both serum cytokines (IL-2, IL-10, TNF- α) and cellular markers on lymphocytes (PD-1, CTLA-4, CD95), was firmly underscored by the results obtained. Longitudinal monitoring of these indicators at key intervals after starting immunotherapy allowed for the capture of immune remodeling throughout treatment and early identification of predictive signals. Post-therapeutic increases in IL-2 and TNF- α proved particularly relevant prognostically, especially the level of IL-2 measured at three months, which emerged as a robust early predictor of survival, while elevated TNF- α correlated positively with favorable clinical outcomes—a notable finding given the ambivalent role of this cytokine in oncogenesis. In contrast, IL-10 did not show a consistent link with prognosis in the studied cohorts, despite dramatic variations in some melanoma patients, suggesting context-dependent effects possibly masked by other regulatory mechanisms. Additionally, checkpoint markers evaluated on circulating lymphocytes (PD-1/CD95 ratio, proportion of CTLA-4⁺ T cells, etc.) showed significant inter-individual variability, without robust correlations to survival or cytokine profiles. This finding indicates that isolated expression of these immune receptors on peripheral cells is not a sufficient indicator of therapeutic response in the absence of functional context, emphasizing the need for further validation of their utility in larger studies.

The clinical relevance of the analyzed biomarkers is evident in their potential integration into therapeutic guidance. For example, an initially pro-inflammatory immune profile (such as high baseline TNF- α) and early increases in favorable cytokines (IL-2, TNF- α) under immunotherapy could signal patients with a higher probability of durable clinical benefit, allowing their stratification for optimal management. Conversely, absence or inversion of these dynamics could indicate primary or secondary resistance, suggesting the need to adjust the therapeutic strategy (for instance, by adding other interventions). Thus, real-time monitoring of the immune response becomes a promising tool for personalizing immunotherapy, enabling treatment adjustments according to each patient's biomarker profile.

Despite these scientific contributions, the limitations of the studies require caution in interpretation. The relatively small cohort sizes as well as loss of some patients to follow-up (due to unfavorable outcomes) may reduce statistical power. Nevertheless, the clear patterns observed, the immunological differences between NSCLC and melanoma, the beneficial role of sustained immune activation, and the lack of impact of certain static biomarkers provide a solid direction for future research.

The future in this field should include prospective studies with larger, heterogeneous, ideally multicentric cohorts to validate the robustness of these biomarkers as predictive and prognostic tools. Additionally, expanding investigations toward combined therapies (for example, combining immunotherapy with radiotherapy or other immune response modulators) is justified by the mechanistic insights obtained, aiming to synergistically enhance the antitumor effect and overcome immune escape mechanisms. Finally, deepening the understanding of biological mechanisms—especially elucidating the dual roles of complex cytokines such as IL-10 and TNF- α —will be essential for optimizing future treatment approaches.

In conclusion, the results of this thesis underscore the importance of dynamic and integrated immune profiling in cancer immunotherapy, opening perspectives for the clinical application of biomarkers in guiding therapeutic decisions and the development of personalized, adaptive treatment strategies designed to improve patient outcomes and overcome the challenges of resistance to immunotherapy.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH

The series of three studies proposes an innovative approach to immunotherapy monitoring in solid tumors through a prospective, longitudinal design carried out in real-world clinical practice. This concept enabled uniform measurement of immunological markers at predetermined time points during therapy, capturing the dynamics of the immune response and overcoming the limitations of cross-sectional, retrospective analyses. As a result, the clinical relevance is heightened, with findings reflecting real-life progressions encountered in current patient care.

A central methodological contribution is the simultaneous integration of cytokine profiling (IL-2, IL-10, TNF- α by ELISA) with cellular immunophenotyping (PD-1, CTLA-4, CD95, CD8⁺ subpopulations by flow cytometry) in the same patients and at identical moments. This holistic vision, correlating the humoral and cellular branches, allows functional relationships between mediators and lymphocyte status under PD-1 blockade to be investigated, demonstrating the feasibility of integrated biomonitoring in clinical settings.

Analytically, the studies leverage mixed linear models and nonparametric correlation analyses (Spearman) to extract robust signals from longitudinal, heterogeneous, and small-sized datasets. This statistical rigor, rarely systematically applied in routine immunotherapy monitoring, made it possible to detect subtle temporal patterns and monotonic associations between biomarkers and clinical endpoints.

Scientific contributions include original correlations between biomarker dynamics and clinical efficacy. In NSCLC, early increases in IL-10 under therapy were associated with unfavorable outcomes, proposing IL-10 as an early predictor of therapeutic failure. Conversely, dynamically assessed TNF- α (especially at later intervals) correlated with prolonged clinical benefit, suggesting a potentially beneficial role for controlled inflammation in mediating antitumor response. Differences between NSCLC and melanoma, from baseline levels to the amplitude of cytokine responses and PD-1/CD95 profiles, highlight tumor-specific immunological features, underscoring the need for indication-adapted monitoring algorithms.

Beyond results, the thesis provides know-how through integrated protocols for sampling and analysis, longitudinal data visualizations that connect individual

variability with group trends, and an analytical infrastructure (scientific programming) that is easily transferable to future studies.

Looking forward, the expansion of dynamic biomonitoring is proposed through the integration of molecular profiling (NGS, advanced IHC) and recently discovered clinically impactful alterations (SMARCA4, STK11, KEAP1) into a multidimensional and personalized framework. This direction aims to refine patient selection and monitoring for immunotherapy, with potential to optimize therapeutic decisions and maximize clinical benefit.