



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI

HABILITATION THESIS

*Physiopathology – a bridge, not a wall
from molecular mechanisms to clinical signs*

ABSTRACT/REZUMAT

**Associate Professor,
Roxana Irina Iancu, MD, PhD**

2023

ABSTRACT

The habilitation thesis briefly presents the most important professional, academic and especially scientific achievements obtained after the completion of the doctoral studies (2006-2022) but also some of the future projects for the years to come. The structuring of this thesis is carried out in accordance with the recommendations of the National Council for Attestation of University Titles, Diplomas and Certificates (CNATDCU) and the methodology of the Doctoral School of the "Grigore T. Popa" University in Iasi. The skill thesis consists of three sections as follows.

Section I presented postdoctoral professional, academic and scientific achievements, concentrating the reference results of own research activity completed by publishing the data in specialized journals. Chapter I represents the summary of some studies related to the pathogenesis of the atherosclerotic process. Since the first years of my activity, my scientific curiosity has been related to the interaction of some basic physiopathological processes: inflammation, coagulation and atherosclerosis. Atherosclerosis, an extremely widespread condition, occurs as a consequence of proliferative inflammation of the endothelium, through the gradual accumulation of cholesterol in macrophages and foam cells. As it progresses, these deposits narrow the arterial lumen, the rupture of the plaque complicated by thrombosis completes the obstruction. Platelets participate not only in the thrombotic complication of the atheromatous lesion but also in the initiation and progression of atherosclerotic plaques. Basically, platelets represent "a bridge" between two pathological processes inflammation and thrombosis and are strongly involved in the pathogenesis of atherosclerosis. Inflammation is characterized by interactions between platelets, leukocytes and endothelial cells, processes that lead to the recruitment of leukocytes into the vascular wall. Chronic platelet-induced inflammatory processes in the vascular wall result in the development of atherosclerotic lesions and atherothrombosis. The interaction between platelets and endothelial cells occurs in two ways: activated platelets can adhere to the unactivated endothelial cell or resting platelets can adhere to the activated endothelial cell. At the same time, the interaction between the activated platelet and the activated endothelial cell may occur. This involves complex interactions between membrane glycoproteins (adhesion molecules) on both endothelial cells P-selectin (CD62P), E-selectin, ICAM-1 and VCAM β 3 integrins, ICAM-1 and the platelet surface receptors GPIIb/IIIa and PSGL-1, GPIb/IX/V, GP IIb/IIIa, platelet factor 4 (PF-4), a member of the C-X-C subfamily of chemokines that induces monocyte chemotaxis by promoting low-density lipoprotein (LDL) retention. Also, inflammation induces an oxidative stress responsible for the production of Lox. At the same time, PDGF released by platelet granules stimulates the proliferation of muscle cells and produces hyperplasia (another cause that reduces the diameter of the vascular wall).

The experiments performed addressed the study of the endothelial cell in the inflammation-atherosclerosis interaction. The scientific and practical deepening of the experimental methods for the investigation of platelets (within the doctoral studies) continued with an experimental activity related to the functional involvement of platelets in the atherosclerosis process. Experimental studies on the interaction between platelet and endothelium in the atherosclerosis process are described in subchapters I.1, I.4, I.6. Chapter I.2 refers to the interaction between different platelet morphological and functional parameters and subchapters I.3 and I.5 respectively represent extensive experimental studies related to the influence of factors such as diet (enriched with lipids, with polyunsaturated fatty acids -PUFA, vitamin E and whole grains) and hormonal status on aspects of the development of atherosclerosis (lipid status, platelet function, and anatomical-pathological aspects).

Chapter II focuses on oromaxillofacial cancer as the main axis of research, starting from molecular and subcellular studies of tumor progression mechanisms and continuing with clinical aspects in patients with cancer of the oromaxillofacial sphere. The interest in this subject began with my inclusion as a researcher in the study carried out by Contract grant CNCISIS 61GR/16.05.2006, Title - "ASSESSMENT OF THE ANTI-TUMOR EFFECT OF VITAMIN D IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK CARCINOMA" Director - Prof. Dr. Veronica Mocanu. Being a teaching staff of the Faculty of Dental Medicine, the interest in this subject continued afterwards.

The "biological era" of cancer treatment began in the 1950's after the discovery of the structure of DNA by Watson and Crick. Subsequent studies have led to a deep understanding of the molecular mechanisms that drive neoplastic transformation, progression and response to therapy. Cancer treatments focused on specific molecular targets and pathways are becoming more common.

Chapter II begins with an overview of some aspects related to the only known pathogen involved in the pathogenesis of oral cancer, *Human Papillomavirus* (HPV) and the ways through which infection with it mediates oral carcinogenesis (II.1). The following subchapters refer to other aspects related to the involvement of subcellular pathways and structures in the mediation of oral carcinogenesis, but also their use as targets in the modern, multimodal treatment of oral cancer.

Chapter II.2 deals with the EGFR pathway, a recognized oncogene whose overexpression or mutation in oral cancer is much debated. EGFR immunotherapy was the first "biological target" approved for oral cancer. Cetuximab is a monoclonal antibody that targets the extracellular ligand-binding domain of EGFR. One of the proposed mechanisms of Cetuximab resistance is the expression of the tumor-specific EGFR deletion mutant EGFRvIII. Next-generation sequencing (NGS) assays are used to detect EGFR exon 20 insertions, mutations that may confer distinct therapeutic features compared to exon 19 deletions. Amivantamab, a dual-acting antibody on both EGFR mutation and receptor activity mesenchymal transition factor (MET) and on immune cells as well as Pozitinib, a next-generation tyrosine kinase inhibitor for targeting exon 20 aberration in EGFR appear to be new therapeutic promises in oral cancer.

Micro-RNAs represent evolutionarily conserved non-coding RNA fragments evaluated as potential biomarkers in numerous diseases, including cancer, but also with the potential of intrinsic predictors in concurrent or sequential systemic treatment. Chapter II.3 represents a meta-analysis related to the "signature" of *Micro-RNAs* in understanding the different response to treatment, with a special focus on the differentiation of HPV+ and HPV- subtypes of oral cancers. Anticipating the risk of toxicity associated with radiochemotherapy, the possibility of obtaining loco-regional control after treatment and assessing the risk of recurrence and distant metastasis represent the advantages of knowing the epigenetic mechanisms of cancerogenesis.

p53, initially considered a tumor suppressor was the subject of research in chapter II.4. The scientific knowledge of the current molecular biology has made a decisive contribution to the understanding of the mechanisms involved in the p53 pathway by identifying an increasing number of post-transcriptional targets but also to the understanding of the apoptotic mechanisms mediated by p53. The possibility of using HPV status, p53, and miRNA as biomarkers for therapy selection, as well as the updated interest in tumor metabolism as a possible target involving the restoration of p53 function may benefit therapeutic response.

Fundamental studies were related to aspects of apoptosis in neoplastic cells and to the relationships between cytosolic and mitochondrial calcium concentration in the apoptotic process as well as the response of the endoplasmic reticulum to stress as an adaptive pathway in carcinomatous progression. These studies were the subject of chapters II.5 and II.6. We also studied the influence of the calcium ionophore on the mitochondrial permeability pore (PTM) in normal, treated cells as well as in a cancer cell line. The following study is related to the genetic polymorphism of the proinflammatory cytokines TNF α (tumor necrosis factor α) and interleukin 1 (IL1) in potentially malignant oral inflammatory lesions. The action of cytosporin B, a NUR77 agonist, on the apoptosis of pro-B lymphocytes (a murine pro-B lymphocyte cell line dependent on interleukin-3) in the presence of gingival fibroblasts in culture was the subject of a subsequent experiment.

Chapter II.7 presents new theoretical and experimental aspects of capecitabine and its much better known metabolite, 5FU (5 Fluorouracil) in tumor progression. An experimental model on the *in situ* release of 5FU from adapted formulas, through the theoretical multifractal model revealed a different release trend, depending on the crosslink density of the support reaching 96% for a high crosslink density.

In section II, future projects are presented in professional, academic and research terms

The thesis is completed by a selection of bibliographic references cited in this habilitation thesis.

Rezumat

Teza de abilitare prezintă pe scurt cele mai importante realizări profesionale, academice și în special științifice obținute după finalizarea studiilor doctorale (2006-2022) dar și o parte din proiectele de viitor pentru anii ce vor urma. Structurarea acestei teze este realizată în conformitate cu recomandările Consiliului Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare (CNATDCU) și a metodologiei Școlii Doctorale a Universității "Grigore T. Popa" din Iași. Teza de abilitare este alcătuită din trei secțiuni după cum urmează.

Secțiunea I prezintă realizările profesionale, academice și științifice obținute postdoctoral, concentrând rezultatele de referință ale activității proprii de cercetare finalizate prin publicarea datelor în reviste de specialitate. Capitolul I reprezintă sumarul unor studii legate de patogenia procesului aterosclerotic. Încă din primii ani de activitate curiozitatea mea științifică a fost legată de interacțiunea unor procese fiziopatologice de bază: inflamația, coagularea și ateroscleroza. Ateroscleroza, afecțiune extrem de răspândită apare ca o consecință a inflamației proliferative a endoteliului, prin acumularea treptată a colesterolului în macrofage și celulele spumoase. Pe măsura evoluției, aceste depuneri îngustează lumenul arterial, ruptura plăcii complicate de tromboză completează obstrucția. Trombocitele nu participă doar la complicarea trombotică a leziunii ateromatoase ci și la inițierea și progresia plăcilor aterosclerotice. Practic, trombocitele reprezintă „o punte de legătură” între două procese patologice inflamație și tromboză și sunt puternic implicate în patogenia aterosclerozei. Inflamația se caracterizează prin interacțiuni între trombocite, leucocite și celule endoteliale, procese care duc la recrutarea leucocitelor în peretele vascular. Procesele inflamatorii cronice induse de trombocite la nivelul peretelui vascular au ca rezultat dezvoltarea leziunilor aterosclerotice și aterotrombozei. Interacțiunea dintre trombocite și celulele endoteliale are loc în două moduri: trombocitele activate pot adera la celula endotelială neactivată sau trombocitele în repaus pot adera la celula endotelială activată. În același timp poate apărea interacțiunea dintre trombocitele activate și celula endotelială activată. Aceasta implică interacțiuni complexe între glicoproteine membranare (molecule de adeziune) de pe ambele celule endoteliale P-selectina (CD62P), E-selectină, ICAM-1 și VCAM integrinele $\beta 3$, ICAM-1 și receptorii de suprafață plachetar GPIIb/IX/V, GPIIb/IIIa, factorul trombocitar 4 (PF-4), un membru al subfamiliei C-X-C a chemokinelor care induce chemotaxia monocitelor promovând retenția de lipoproteine cu densitate joasă (LDL). De asemenea, inflamația induce un stres oxidativ responsabil și de producerea de LDLox. În același timp, PDGF eliberat de granulele trombocite stimulează proliferarea celulelor musculare și produce hiperplazie (o altă cauză care reduce diametrul peretelui vascular).

Experimentele efectuate s-au adresat studiului celulei endoteliale în interacțiunea inflamație-ateroscleroză. Aprofundarea din punct de vedere științific dar și practic a metodelor experimentale de investigarea a trombocitelor (în cadrul studiilor doctorale) a continuat cu o activitate experimentală legată de implicarea plachetelor din punct de vedere funcțional în

procesul aterosclerozei. Studii experimentale privind interacțiunea dintre trombocit și endoteliu în procesul aterosclerozei sunt descrise în subcapitolele I.1, I.4, I.6. Capitolul I.2 se referă la interacțiunea dintre diferiți parametri morfologici și funcționali plachetari iar subcapitolele I.3 respectiv I.5 reprezintă studii experimentale extinse legate de influența unor factori cum ar fi dieta (îmbogățită cu lipide, cu acizi grași polinesaturați -PUFA, vitamina E și cereale integrale) și statusul hormonal asupra aspectelor dezvoltării aterosclerozei (status lipidic, funcție plachetară, și aspecte anatomo-patologice).

Capitolul II vizează cancerul oromaxilofacial ca ax principal al cercetării plecând de la studii moleculare și subcelulare ale mecanismelor de progresie tumorală. Interesul pentru acest subiect a început cu includerea ca cercetător în studiul desfășurat prin Contractul grant CNCIS 61GR/16.05.2006 cu titlul "Assessment of the anti-tumor effect of vitamin d in patients with head and neck carcinoma" Director - Prof. Dr. Veronica Mocanu. Fiind cadru didactic al facultății de Medicină Dentară interesul pentru acest subiect a continuat și ulterior.

„Era biologică” a tratamentului cancerului a debutat în anii 1950 după descoperirea structurii ADN-ului de către Watson și Crick. Studiile ulterioare au condus la o înțelegere profundă a mecanismelor moleculare care conduc la transformarea, progresia și răspunsul la terapie neoplazice. Tratamentele pentru cancer axate pe ținte și căi moleculare specifice devin din ce în ce mai frecvente.

Capitolul II debutează cu o punere la punct a unor aspecte legate de singurul patogen cunoscut implicat în patogeniza cancerului oral, *Human Papillomavirus* (HPV) și căile prin care infecția cu acesta mediază carcinogeneza orală (II.1). Subcapitolele următoare se referă la alte aspecte de legate de implicarea unor căi și structuri subcelulare în medierea a carcinogenezei orale dar și folosirea acestora ca ținte în tratamentul modern, multimodal al cancerului oral.

Capitolul II.2 se referă la calea EGFR, o oncogenă recunoscută a cărei supraexpresie sau mutație în cancerul oral este mult discutată. Imunoterapia EGFR a fost prima ”țintă biologică” aprobată pentru cancerul oral. Cetuximab este un anticorp monoclonal care vizează domeniul extracelular de legare a ligandului EGFR. Unul dintre mecanismele propuse de rezistență la Cetuximab este expresia mutantului de deleție EGFR specific tumorii EGFRvIII. Testele de secvențiere de ultimă generație (NGS) sunt folosite pentru a detecta inserțiile exonului 20 EGFR, mutații care pot conferi caracteristici terapeutice deosebite în comparație cu delețiile exonului 19. Amivantamab, un anticorp cu dublă acțiune atât asupra mutației EGFR, cât și asupra activității receptorului factorului de tranziție epitelial mezenchimal (MET) și asupra celulelor imune precum și Pozitinib, un inhibitor de tirozinkinază de ultimă generație pentru țintirea aberației exonului 20 în EGFR par a fi noi promisiuni terapeutice în cancerul oral.

Micro-RNAs reprezintă fragmente de ARN necodant conservate evolutiv evaluate ca potențiali biomarkeri în numeroase boli, inclusiv cancer dar și cu potențialul de predictor intrinsec în tratamentul sistemic concomitent sau secvențial. Capitolul II.3 reprezintă o metaanaliză legată de ”semnătură” *Micro-RNAs* în înțelegerea răspunsului diferit la tratament, cu un accent special pe diferențierea subtipurilor HPV+ și HPV- de cancerle orale. Anticiparea riscul de toxicitate asociat radiochimioterapiei, posibilitatea de a obține un control loco-regional

după tratament și aprecierea riscul de recidivă și metastază la distanță reprezintă avantajele cunoașterii mecanismelor epigenetice ale cancerogenezei.

p53, considerat inițial un supresor tumoral a făcut obiectul cercetărilor în capitolul II.4. Cunoștințele științifice ale biologiei moleculare actuale au adus o contribuție decisivă la înțelegerea mecanismelor implicate în calea p53 prin identificarea unui număr tot mai mare de ținte post-transcripționale dar și pentru înțelegerea mecanismelor apoptotice mediate de p53. Posibilitatea utilizării statutului HPV, p53 și miARN ca biomarkeri pentru selecția terapiei, precum și actualizarea interesului pentru metabolismul tumoral ca o posibilă țintă care implică restabilirea funcției p53 pot aduce beneficii în răspunsul terapeutic.

Studiile fundamentale au fost legate de aspecte ale apoptozei în celulele neoplazice și de relațiile dintre concentrația calciului citosolic și mitocondrial în procesul apoptotic precum și răspunsul reticolului endoplasmic la stres ca și cale adaptativă în progresia carcinomatoasă. Aceste studii au făcut obiectul capitolelor II.5 și II.6. Am studiat de asemenea influența ionoforului de calciu asupra porului de permeabilitate mitocondrială (PTM) în celule normale, tratate precum și pe o linie de celule canceroase. Studiul următor este legat de polimorfismul genetic al citokinelor proinflamatorii TNF α (factorul de necroză tumorală α) respectiv interleukina 1 (IL1) în leziunile inflamatorii orale potențial maligne. Acțiunea cytosporinei B, un agonist NUR77, asupra apoptozei limfocitelor pro B (o linie celulară murină de limfocite pro-B dependentă de interleukina-3) în prezența fibroblastelor gingivale în cultură a făcut obiectul unui experiment ulterior.

Capitolul II.7 prezintă noi aspecte teoretice dar și experimentale ale capecitabinei dar și a mult mai cunoscutului său metabolit, 5FU (5 Fluorouracilul) în progresia tumorală. Un model experimental asupra eliberării *in situ* a 5FU din formule adaptate, prin modelul teoretic multifractal a relevat o tendință diferită de eliberare, în funcție de densitatea rețelei reticulare a suportului ajungând la 96 % pentru o densitate mare de reticulare.

În secțiunea II sunt prezentate proiectele de viitor în plan profesional, academic și de cercetare

Teza este completată de o selecție a referințelor bibliografice citate în această teză de abilitare.