



**GRIGORE T. POPA** UNIVERSITY OF  
MEDICINE AND PHARMACY IASI

## **HABILITATION THESIS**

### **From microscopical to molecular profiling in tumor and non-tumor pathology**

**Mihai Danciu, MD, PhD**  
Associate Professor

**2020**

## Abstract

The present habilitation thesis summarizes my professional, academic and, especially, scientific activity during the postdoctoral period (2007-2020). Based on these achievements and according to the international trends I included in the end of the thesis some thoughts on future research directions that I intend to follow.

According to the criteria recommended and approved by the National Council for Attestation of Titles, Diplomas and Certificates (CNATDCU), the thesis is structured on three sections, subdivided as follows:

**Section I** presents a summary of my professional, academic and scientific achievements after obtaining the PhD title.

*Chapter 1* details one of the most important part of my postdoctoral research activities focused on colorectal adenocarcinoma. As promised in the end of my doctoral thesis, I continued the collaboration started with the researchers from Freiburg University, Germany, by studying the expression of serine/threonine kinase 15 (STK15, Aurora A) at proteic and genetic level in chromosomal instable and microsatellite instable sporadic carcinomas. I also studied the expression of adhesion molecules CDX1 and ephrin B receptor genes in case-matched colorectal normal mucosa, adenomas and adenocarcinomas.

When worldwide scientists started to focus on the role of the immune system in antitumor defense and its influence on the evolution of the colorectal cancers, I joined the French research team from Paris who coined the term “Immunoscore”. The project we started aimed to assess the prognostic value of Immunoscore on patients with rectal cancer, to compare it with TNM and to evaluate the predictive value of immune reaction about the response of the tumor to preoperative neoadjuvant chemoradiation therapy.

The interest for developing new, non-invasive diagnostic tools encouraged the collaboration between engineers in electromagnetic wave fields and medical scientists/doctors. Terahertz spectroscopy became a promising diagnostic tool for early detection of pre-malignant lesions of digestive tract (including colon and rectum). Therefore, a review of the literature on this topic could be of real interest for scientists.

My personal contributions resulted in research grants and published articles in: J Mol Med (IF 4.820), Modern Pathology (IF 4.406), Epigenetics (IF 4.318), Clin Cancer Res (IF 8.722) and Materials (IF 3.057).

*Chapter 2* presents the studies regarding celiac diseases, as part of an international multicenter study group (19 centers from 8 countries on 3 continents). A first study aimed to improve the diagnostic accuracy of celiac disease by determining the optimal cut-off of intraepithelial lymphocytes count between normal and celiac disease.

The same international team which included gastroenterologists and pathologists, elaborated the Bucharest Consensus on microscopic enteritis, a new entity characterized by symptomatic malabsorption and subtle deficiency of micronutrients and minimal morphological changes of the duodenal mucosa, corresponding to Marsh I-II stages.

The most important results were published in: Gut (IF 17.016), Endoscopy (IF 4.166), World Journal of Gastroenterology (IF 2.787).

*Chapter 3* presents studies designed to investigate the role of HPV infection in head and neck squamous cell carcinomas using immunohistochemical and biomolecular techniques.

The most important was accomplished in collaboration with researchers from Germany, France, Italy and USA, and aimed to determine the proportion of HPV-associated

head and neck squamous cell carcinomas by analyzing HPV DNA and RNA status, in correlation with p16 expression. The study group included patients diagnosed with HNSCC (oropharynx and outside the oropharynx). The study revealed a low concordance between HPV DNA status and HPV ARN or p16 status, meaning that in Northeastern Romania a small proportion of HNSCC cases appears to be HPV-driven.

The results of these studies were published in national and international journals: PLoS ONE (IF 2.766), Rom J Morphol Embryol (IF 1.411).

*Chapter 4* includes studies regarding the correlation Ghrelin-*H. pylori*-metabolic surgery in obesity, an experimental study on diets and lipid metabolism and an experimental study on the role of adipose-derived stem cells (ADSC) in wound healing.

In the first projects, we immunohistochemically quantified the distribution of ghrelin-producing cells in relation with *H. pylori* infection in stomach from obese patients after sleeve surgery.

The first experimental studies on animal models revealed that differentiated adipocytes achieve similar wound healing results as ADSC and fat injection, but differentiated adipocytes and fat grafting accelerate early healing process. In the second experimental study, we demonstrated that omega3-rich fish-oil confers more protection against cardiovascular risk factors and liver lipid accumulation when given to rats consuming regular diets than when given to rats consuming a high-fat diet. This argues for consumption of a healthy diet rather than to the use of fish-oil supplements.

The results of these studies were published in: Lipids in Health and Disease (IF 2.906), J Burn Care Res (IF 1.923) and Rom J Morphol Embryol (IF 1.411).

**Section II** presents the projects for my future development on professional, academic/teaching and scientific fields.

The first two are strongly interconnected, dedication, excellence and professionalism being the mandatory characteristics of my future activity.

The scientific projects will include research on the correlation between serology and histopathological changes for an accurate diagnosis of celiac disease and differentiate it from other gluten sensitivity entities. Also, I intend to develop studies regarding the PD1 and PD-L1 expression in different types of carcinomas (colo-rectal, head and neck, etc.).

**Section III** includes a list of selected bibliographic references cited in the present habilitation thesis.

## Rezumat

Teza de abilitare printr-o pe scurt, cele mai importante realizări profesionale, academice și, în special, pe cele științifice obținute după finalizarea studiilor doctorale (2007-2020). Pornind de la aceste realizări și în concordanță cu actualele tenduri în cercetarea științifică, am inclus în finalul tezei de abilitare, câteva direcții de cercetare pe care ma voi axa în viitor.

Conform criteriilor recomandate și aprobate de CNATDCU, teze de abilitare este structurată în 3 secțiuni, după cum urmează:

**Secțiunea I** prezintă realizările profesionale, academice și științifice obținute postdoctoral.

*Capitolul 1* detaliază una dintre mai constante activități de cercetare avute în perioada imediat următoare obținerii titlului de doctor în științe medicale: cancerul colo-rectal. După cum am promis la finalul prezentării tezei de doctorat, am continuat colaborarea cu colectivul Departamentului de Patologie din cadrul Universității din Freiburg, Germania, studiind expresia serine/threonine kinazei 15 (STK15/Aurora A) nu numai la nivel proteic, dar și genetic prin studii de biologie moleculară pe un lot de pacienți cu cancer colo-rectal sporadic, cu instabilitate cromozomială sau a sateliților. De asemenea, am studiat expresia molecule de adeziune CDX1 și mutațiile genei receptorului Ephrin B într-un lot de cazuri ce cuprindeau atât mucoasă normală, adenom și carcinom colorectal.

Atunci când oamenii de știință au început să se axeze pe rolul sistemului imun în apărarea antitumorală și pe influența sa în evoluția cancerului colorectal, am avut șansa de a începe o colaborare cu puternicul centru european de cercetări INSERM, Paris, cei care au introdus noțiunea de Imunoscor pentru cancerul de colon. Proiectul a vizat evaluarea Imunoscorului ca factor de prognostic la pacienții cu cancer de rect prin comparație cu sistemul TNM, dar și evaluarea rolului predictiv al inflamației în conexiune cu răspunsul tumorilor la terapia neoadjuvantă preoperatorie.

Interesul crescut pentru identificarea și dezvoltarea de noi tehnici și instrumente de diagnostic non-invaziv a dus la o mai strânsă colaborare între inginerii din domeniul imagisticii și medici. Astfel, spectroscopia cu raze din spectrul terahertzilor pare să fie un instrument cu potențial diagnostic pentru leziunile premaligne ale tractului digestiv. În consecință, un review ce trece în revistă cele mai recente aspecte ale cercetărilor din domeniul medical efectuate cu instrumente ce folosesc unde electromagnetice din spectrul terahertzilor poate fi în interesul cercetătorilor.

Contribuțiile personale în urma acestor cercetări au fost publicate în revistele: J Mol Med (IF 4.820), Modern Pathology (IF 4.406), Epigenetics (IF 4.318), Clin Cancer Res (IF 8.722) și Materials (IF 3.057).

*Capitolul 2* prezintă studiile asupra bolii celiace și enteropatiilor înrudite, studii efectuate ca parte a unei echipe internaționale multicentrice ce a reunit 19 institutii din 8 țări de pe 3 continente. Un prim studiu a vizat creșterea acurateții diagnosticului bolii celiace prin stabilirea de comun acord a unei valori de cut-off pentru numărul de limfocite intraepiteliale cu valoare de graniță între normal și boala celiacă. Același nucleu de cercetători, ce a inclus medici anatomo-patologi și gastroenterologi, a emis Consensul de la București asupra enteritei microscopice, o nouă entitate caracterizată clinic prin sindrom de malabsorbție iar morfologic prin modificări duodenale minime, similare bolii celiace din stadiile March I și II.

Cele mai importante rezultate au fost publicate în Gut (IF 17.016), Endoscopy (IF 4.166) și World Journal of Gastroenterology (IF 2.787).

*Capitolul 3* prezintă o serie de studii în care a fost investigat rolul infecției cu HPV în carcinoamele scuamocelulare din regiunea capului și gâtului, prin metode de imunohistochimie și tehnici de biologie moleculară.

Cel mai important studiu a fost realizat printr-o colaborare cu centre de cercetare din Germania, Franța, Italia și Statele Unite; scopul a fost de a se determina proporția de cazuri cu implicare HPV din totalul tumorilor din sfera cap-gât, prin analiza ADN-ului și ARN-ului HPV, în corelație cu expresia imunohistochimică a p16. Lotul de studiu a inclus pacienți din Iași, diagnosticați cu carcinom scuamocelular orofaringian sau extra-orofaringian. Am constatat că în regiunea noastră, carcinoamele asociate cu infecție cu HPV au o pondere redusă.

Rezultatele au fost publicate în revistele: PLoS ONE (IF 2.766) și Rom J Morphol Embryol (IF 1.411).

*Capitolul 4* include studii cu privire la relația dintre celulele secretoare de Ghrelin, infecția cu *H. pylori* și chirurgia bariatrică a obezității, și studii experimentale pe model animal privind rolul acizilor grași polinesaturați din dietă asupra metabolismului lipidic și privind rolul celulelor stem derivate din adipocite în vindecarea plăgilor.

În privința studiului obezității, am cuantificat imunohistochimic distribuția celulelor secretoare de ghrelin corelată cu prezența infecției cu *H. pylori* la pacienții obezi tratați prin chirurgie bariatrică.

Studiile experimentale pe model animal au demonstrat că adipocitele diferențiate contribuie la vindecarea plăgilor induce experimental similar celulelor stem derivate din adipocite sau țesutului adipos injectat, iar adipocitele diferențiate și grefele cu țesut adipos accelerează procesul de vindecare. Al doilea studiu experimental a demonstrat că uleiul de pește bogat în omega3 are rol protectiv împotriva factorilor de risc cardio-vasculari și a steatozei hepatice dacă este administrat simultan unei diete echilibrate și nu ca supliment la o dietă bogată în grăsimi.

Rezultatele au fost publicate în: Lipids in Health and Disease (IF 2.906), J Burn Care Res (IF 1.923) and Rom J Morphol Embryol (IF 1.411).

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

Primele două sunt puternic interconectate, câteva trăsături fiind comune: dedicarea, excelența și profesionalismul.

Viitoarele proiecte științifice vor include cercetări asupra corelației dintre determinările serologice și modificările histopatologice în scopul unui diagnostic cât mai precis al bolii celiace și diferențierea de alte entități caracterizate prin sensibilitate la gluten. O altă direcție de cercetare va fi legată de expresia PD1 și PD-L1 în diferite tipuri de carcinoame (colo-rectal, cap-gât, și altele).

**Secțiunea III** include o selecție a referințelor bibliografice citate în această teză de abilitare.