

REZUMAT

În cadrul acestei lucrări vor fi prezentate cele mai importante realizări științifice ale d-nei dr. Cristina-Adela Iuga, obținute după susținerea tezei sale de doctorat la Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", ca o dovadă a expertizei sale pentru deținerea gradului de abilitat. Incepand cu anul 2003, dr. Cristina-Adela Iuga a realizat studii laborioase în domeniul controlului calității medicamentului. Datorită interesului crescut al industriei farmaceutice în dezvoltarea și producerea de medicamente biologice de natură proteică (biofarmaceutice, anticorpi monoclonali, peptide sintetice) pentru terapie la țintă, aria de interes a fost extinsă către dezvoltarea de metode analitice de înaltă performanță aplicabile în domeniul asigurării calității și stabilității acestora. Următorul pas în dezvoltarea carierei științifice a d-nei Dr. Cristina-Adela Iuga a fost acela de a utiliza cunoștințele dobândite până atunci în noile tehnologii omice - proteomică și metabolomică-pentru descoperirea și validarea de biomarkeri cu utilitate clinică.

Proiectele de cercetare derulate în această perioadă, au fost planificate și realizate în laboratoare din România (Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Institutul de Gastroenterologie și Hepatologie "Octavian Fodor", Cluj Napoca) și în Germania (Department of Functional Genomics, Interfaculty Institute of Genetics and Functional Genomics, Institute of Biochemistry, University Medicine Greifswald).

Dr. Iuga Cristina-Adela s-a concentrat în principal pe dezvoltarea și validarea specifică domeniului asigurării calității medicamentului industrial de metode analitice de înaltă performanță, dar și pentru cercetarea biomedicală cu accent pe tehnici de separare (lichid cromatografie (LC), gaz-cromatografia (GC) electroforeză în gel (GE)), cuplate cu detecție UV-VIS, fluorescență (FLD) sau spectrometrie de masă în tandem (MS/MS).

Cele mai importante realizări științifice, evidențiate în teza sa, pot fi descrise după cum urmează:

- ✓ dezvoltarea și validarea de metode analitice și bio-analitice aplicabile în asigurarea calității medicamentelor (pre-formulare, formulare, produse finite), a suplimentelor alimentare și în studii de bioechivalență/biodisponibilitate.

- ✓ dezvoltarea și validarea de metode aplicate în proteomică (cromatografie de lichide cuplată cu spectrometria de masă de înaltă rezoluție - nanoLC/HDMSE, protein array)
- ✓ dezvoltarea și validarea metodelor analitice aplicate în metabolomică (cromatografie de lichide, gaz-cromatografie cuplate cu spectrometria de masă în tandem)

După susținerea tezei de doctorat în anul 2003, activitățile sale de cercetare s-au concentrat pe dezvoltarea și validarea de metode cromatografice, spectrofotometrice și termice aplicate pentru controlul calitatii principiilor active în materiile prime dar mai ales în formele farmaceutice, evaluarea compatibilității medicament-medicament, medicament-excipient, excipient-excipient în etapa de preformulare și formulare a formelor farmaceutice industriale. De asemenea, a dezvoltat și validate metode aplicate în studii de bioechivalență și biodisponibilitate în colaborare cu industria farmaceutică.

Începând cu anul 2008, dr. Cristina-Adela Iuga și-a extins domeniul de cercetare către metodele analitice de înaltă rezoluție - nano-cromatografie cuplată cu spectrometria de masă în tandem aplicate pentru a evalua calitatea și stabilitatea medicamentelor biologice, în special produse din sânge (concentratul trombocitar). În colaborare cu o echipă internațională a participat la identificarea căilor moleculare, implicate în apariția leziunilor trombocitare pe perioada de stocare a concentratului trombocitar (PSLs). Utilizând o combinație de separare prin electroforeză pe gel de poliacriamidă, urmată de o analiză prin cromatografie de ultraînaltă performanță (UHPLC) și folosind un instrument bioinformatic performant Igenuity Pathway Analysis (IPA) s-a reușit evaluarea detaliată a stabilității concentratului trombocitar și identificarea mecanismului de apariției a leziunilor de conservare. Pe baza acestor rezultate au fost realizate în continuare studii aprofundate care au evaluat influența metodelor de inactivare a patogenilor din concentratele trombocitare (PC). Astfel, în următorul studiu, au fost evaluate modificările proteomului trombocitar induse de procedurile de inactivare a patogenilor, cum ar fi reducerea germenilor prin tratare cu amotosalen/UVA și iradiere gama. A fost utilizată o metodologie analitică de LC-ESI-MS/MS specifică proteomicii. În urma acestui studiu a putut fi estimată perioada de valabilitate a acestui produs de sânge, care asigură eficacitatea lui optimă.

În anul 2010, folosind cunoștințele de proteomică acumulate, a participat într-un studiu colaborativ care a avut drept scop descoperirea și validarea de biomarkeri cu utilitate clinică în adenocarcinom ductal de pancreas (PDAC). Cancerul de pancreas este o boală devastatoare cu o rată de mortalitate aproape identică cu incidența lui. În acest context, elucidarea proteomului tisular al pancreasului a câștigat o atenție considerabilă deoarece se considera ca realizarea profilului proteic ar putea permite o eventuală stadializare, dar și o potențială estimare a progresiei bolii. Prin urmare, obiectivul acestei cercetări a fost acela de a investiga modificările apărute în proteomul tisular al pacienților care suferă de adenocarcinom ductal de pancreas (PDAC) prin intermediul unei abordări cuprinzătoare cantitative. Pentru proteinele selectate concluziile au fost verificate print-un instrument proteomic la țintă (selected reaction monitoring - SRM), validate prin imunohistochimie și prin Western blotting (WB) și a fost discutată valoarea lor ca potențiali biomarkeri.

Datorită faptului că serul și plasma sunt fluide biologice ce pot fi recoltate prin metode puțin invazive, următoarele studii de identificare și validare a potențialilor biomarkeri cu utilitate clinică în cancerul de pancreas au fost realizate pe aceste matrici. Aceștia ar putea servi ca biomarkeri de diagnostic, prognostic dar și de predicție la terapie în practica clinică de rutină. Instrumentul analitic utilizat în acest caz a fost cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HDMS). S-a optat pentru dezvoltarea unei metode de cuantificare absolută a proteinelor serice, urmată de identificarea și validarea de paneluri proteice plasmatică. De asemenea, au fost identificați în prealabil factorii pre-analitici care influențează rezultatele experimentale probleme cum sunt modalitățile de colectare și stocare a probelor. Rezultatele au arătat că impactul modalităților de colectare a probelor de ser/plasmă ar trebui întotdeauna luat în considerare în studiile de evaluare calitativă și cantitativă a proteinelor plasmatică în studii de proteomică.

Eforturile de diagnosticare precoce al adenocarcinomului ductal pancreatic (PDAC) au atras atenția către studierea leziunilor precursore, și anume asupra papilomului mucinos intraductal de pancreas (IPMN). În acest sens a fost realizată o evaluare comparativă a profilelor proteice plasmatică pentru voluntari sănătoși, pancreatita cronică, papilom mucinos intraductal de pancreas (IPMN) și adenocarcinom ductal de pancreas (PDAC). Platforma analitică utilizată a fost cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de

masă în tandem cu achiziție independentă de date (IDA). În urma acestui studiu, au fost identificate mai multe seturi de proteine care ar putea ajuta la diagnosticarea IPMN, dar, de asemenea, ar ajuta la diferențierea IPMN spre boli benigne sau maligne ale pancreasului.

Un alt instrument analitic mult utilizat în identificarea și validarea de biomarkeri proteici este reprezentat de metodele imunoenzimatiche, în special metoda ELISA. Într-un studiu complex legat de cercetarea cancerului mamar, această metodă a fost utilizată pentru a evalua influența izoflavonelor din soia asupra principalelor citokine implicate în angiogeneză. Identificarea și cuantificarea moleculelor cheie implicate în angiogeneză a oferit informații noi legate de proprietățile anti-angiogenetice ale izoflavonelor din soia. Până în prezent, acesta este primul studiu care evaluează potențialul anti-angiogenetic al unui compus natural în cancerul de sân folosind această abordare.

Proteomica bazată pe spectrometria de masă, respectiv metodele imunoenzimatiche se constituie în instrumente analitice esențiale în descoperirea și validarea de biomarkeri pentru cercetarea farmaceutică și biomedicală. Acestea oferă informații valoroase medicilor în efortul de a transla cunoștințele dobândite în cercetare către practica clinică.

O altă direcție de cercetare abordată de dr. Cristina-Adela Iuga este metabolomica, pe care a dezvoltat-o începând cu anul 2013, în scopul de a obține informații complementare celor furnizate de proteomică în studiile legate de cancer. Metabolomica a cunoscut o dezvoltare deosebită în ultimii ani, în mare parte datorită dezvoltării tehnologiei analitice care și-au îmbunătățit semnificativ rezoluția și sensibilitatea. Platformele analitice utilizate în metabolomică includ spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN) și tehnici cromatografice, cum ar fi gaz-cromatografia (GC) și cromatografie de lichide (LC), cuplat la diverse tipuri de spectrometre de masă (SM).

În această direcție, a fost studiat metabolomul intra- și extracelular pe linii celulare de cancer de sân (estrogen dependente MCF-7, respectiv fără receptori estrogenici MDA-MB-231) după expunerea la diferite concentrații de izoflavone. Acest studiu a contribuit la îmbogățirea cunoștințelor actuale în domeniu, oferind o evaluare cuprinzătoare a modificărilor metabolice induse de izoflavone în liniile celulare studiate. Obiectivul general al acestui studiu a fost de a investiga efectele la nivel celular (citotoxicitate și anti-angiogenetic) dar și mecanismele metabolice afectate de expunerea la izoflavonele

din soia în două linii celulare de cancer diferite sân. Acest studiu a evidențiat efectul dual al izoflavonelor din soia asupra liniilor celulare estrogen dependente și stabilit concentrațiile acestor compuși care vor fi utilizate în studiu. În plus, s-a încercat identificarea modificărilor metabolice induse de izoflavone ce au fost induse de efectul dual al izoflavonelor observat anterior.

După știința noastră, până în prezent pentru izoflavonele din soia a fost realizat un singur studiu de acest tip în care au fost comparate profilurile metabolice intracelulare pentru o linie de celule normale, respectiv una de cancer de sân expuse 17- β -estradiol, genisteină sau un extract de rădăcină de in. Prin urmare, acest studiu este primul care abordează metabolomul extracelular și intracelular, utilizând două linii celulare diferite de cancer sân, una estrogen dependentă și una fără receptori estrogenici. Rezultatele obținute oferă o imagine de ansamblu a modificărilor metabolice induse de izoflavonele din soia asupra liniilor celulare din cancerul de sân.

După susținerea tezei de doctorat, autoarea a publicat 38 de lucrări științifice (22 ISI din care 11 ca prim autor, 16 BDI) în domeniile menționate mai sus. Dintre cele 11 articole cotate ISI în care are calitatea de autor principal, 2 sunt publicate în reviste situate în Q1 și 3 sunt publicate în reviste situate în Q2 după clasificarea ISI Thompson (Proteomics (Q1), Molecules (Q2), International Journal of Molecular Sciences (Q2), Pharmaceutics (Q1)).

În aceeași perioadă, autorul a coordonat ca investigator principal (PI) 1 grant național și a participat ca membru în alte 9 granturi obținut prin competiție națională, a avut calitatea de mentor al unui grant intern (Heghes) (2016-2018). Are calitatea de primautor pentru 2 cărți, co-autor pentru 2 carti și a scris 7 capitole in cărți de specialitate

Direcțiile de cercetare viitoare ale d-nei dr. Cristina-Adela Iuga se vor orienta către:

- ✓ dezvoltarea de noi tehnici ultrasensibile pentru dezvoltarea de medicamente și controlul calității produselor farmaceutice și biofarmaceutice industriale;
- ✓ descoperirea și validarea noi paneluri de biomarkeri proteici cu relevanță clinică în cancer prin intermediul proteomicii;
- ✓ descoperirea și validarea biomarkeri metabolici cu relevanță clinică în cancer cu ajutorul metabolomicii;

În același timp, activitățile didactice implicând cursuri și lucrări practice în analiza medicamentului, medicamente biologice și metodologia cercetării va fi îmbunătățită continuu prin adăugarea de noi aspecte științifice și/sau subiecte de interes în concordanță cu evoluțiile științifice din domeniu.

ABSTRACT

The major scientific achievements in the field of pharmaceutical analysis and “omics” technologies applied in pharmaceutical and biomedical research of Associate Professor Cristina-Adela Iuga, obtained after the acquirement of his doctoral degree at “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy are highlighted in this thesis as a proof of his qualification for the habilitation degree. Since 2003, Associate Professor Cristina-Adela Iuga has performed extensive research activities in the field of quality control of pharmaceuticals. Due to the high interest of pharmaceutical industry to develop biological drugs (e.g. biopharmaceuticals, monoclonal antibodies, synthetic peptides) for targeted therapies she extended the research area of interest to high-throughput analytical methods used in quality assurance of biopharmaceuticals. The next step was to exploit this knowledge in the field of biomarker discovery and validation by proteomic and metabolomic tools.

The research projects were designed and done in several research facilities in Romania (Faculty of Pharmacy, Research Center for Advanced Medicine – MedFuture, University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, Institute of Gastroenterology and Hepatology “Octavian Fodor”, Cluj-Napoca) and/or Germany (Department of Functional Genomics, Interfaculty Institute of Genetics and Functional Genomics, Institute of Biochemistry, University Medicine Greifswald)

Dr. Cristina-Adela Iuga mainly focused on understanding the specific requirements of high-throughput methods development and validation for pharmaceutical industry and biomedical research applications with emphasis on separation techniques (liquid chromatography (LC), gas chromatography (GC), gel electrophoresis (GE)) coupled with ultraviolet (UV) or fluorescence (FLD) detection and tandem mass spectrometry (MS/MS).

The most important scientific achievements, highlighted in her thesis, can be described as follows:

- ✓ Analytical and bio-analytical methods development and validation applied in quality assurance of drugs (pre-formulation, formulation, pharmaceutical dosage forms), of food supplements and bioequivalence/bioavailability studies

- ✓ The development and validation of proteomic tools applied for biomarkers discovery and validation (liquid chromatography coupled with High definition mass spectrometry - nanoLC/HDMSE, protein array)
- ✓ The development and validation of analytical methodologies applied for metabolic profiling such as liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS/MS)

After his Ph.D. defence in 2003, her research activities were focused on the development and validation of chromatographic, spectrophotometric and thermal analysis methods applied for quality control of active principle (API) in raw materials and dosage forms, compatibility evaluation in pre-formulation and formulation stage and stability studies of pharmaceutical dosage forms. Also, she developed and validated bioanalytical methods applied in bioequivalence and biodisponibility studies in collaboration with pharmaceutical industry.

Starting with 2008, she extended her research interest to high throughput analytical tools like as nano-chromatography and tandem mass spectrometry applied to assess the quality and stability of biological drugs, particularly blood products (platelets). She joined an international team who assessed for the first time the molecular pathways, involved in platelet storage lesions (PSLs) of platelet concentrate (PCs). A combination of gel based and a gel free proteomic analysis together with the bioinformatic tool ingenuity pathway analyses (IPA) allowed detailed assessment of platelets concentrate stability. These findings facilitate further studies to better understand the potential biological effects of pathogen inactivation procedures on PCs. In the next study, the alterations in platelets induced by pathogen inactivation procedures like amotosalen/UVA pathogen reduction and gamma irradiation by a LC-ESI-MS/MS-based proteomics approach were assessed and the shelf-life of this blood product was recommended.

In 2010, in a joint research, she started to make use of the proteomic tools for biomarker discovery and validation in pancreatic diseases. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease with a mortality rate almost identical with its incidence. In this context, the investigation of the pancreatic cancer proteome has gained considerable attention because profiles of proteins may be able to identify disease states and progression more accurately. Therefore, the objective of her research was to investigate the changes in the tissue proteome of patients suffering from

pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) by a comprehensive quantitative approach. For selected proteins the findings were verified by targeted proteomics (SRM), validated by immunohistochemistry and Western blotting and their value as candidate biomarkers discussed.

Due to the fact that proteome-based biomarker studies are targeting serum/plasma proteins that could serve as diagnostic, prognosis, and prediction molecules in the clinical routine, a mass spectrometry based absolute quantification method for the verification of plasma protein sets which might serve as reliable biomarker panels for the clinical practice was developed and validated. Also, pre-analytical issues such as the sample collection method affecting the integrity of blood samples were rigorously evaluated in her research. Therefore, the impact of blood sample collection methods should be always considered for qualitative and quantitative protein profiling protein. The results of these studies were exploited further.

Efforts for the early diagnosis of the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) have recently been driven to one of the precursor lesions, namely intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas (IPMN). Therefore, plasma proteins in the presence of IPMNs in comparison to healthy controls, chronic pancreatitis, and PDAC by a proteomics approach using data-independent acquisition based mass spectrometry was performed. Several protein sets that could aid IPMN diagnosis, but also differentiation of IPMN to benign or malignant diseases were identified.

Another analytical tool used frequently for the biomarker identification and validation are immune-enzymatic assays, in particular the ELISA assay. In a complex study related to breast cancer research, she contribute also to development and validation of an glass slides ELISA based array method to evaluate the influence of soy isoflavones on the main cytokines involved in angiogenesis. The identification and quantification of the key molecules involved in angiogenesis provided a further understanding of isoflavones' anti-angiogenetic properties. To date, this is the first study to test the anti-angiogenetic potential of a natural compound on breast cancer cells using this approach.

Mass spectrometry based proteomics and protein array technology were valuable tools applied in biomedical research for biomarker discovery and validation and provided valuable information to physicians in the effort to translate the gained knowledge into clinical practice.

Another research direction of Dr. Cristina-Adela Iuga is metabolomics. In 2014, her research interest turned to metabolomics applied in breast cancer research in order to get complementary information to proteomic data. The increased attention that metabolomics has received in the last years is largely due to the technological development that strongly improved resolution and sensibility. Usually, the analytical platform includes nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and chromatographic techniques, such as gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) coupled to various mass spectrometers (MS).

In this line, an extracellular and intracellular metabolomic approach, using both estrogen responsive (MCF-7) and non-responsive breast cancer cells (MDA-MB-231) exposed to different isoflavones, at different concentrations, was developed. It contributed to the current knowledge, offering a comprehensive assessment of the metabolic alterations induced by isoflavones in breast cancer cells. The importance of this study was to highlight the twofold effect of soy isoflavones on estrogen responsive cells and to establish the test concentrations that will be used in the further studies. Furthermore, we aimed to find out what metabolic alterations induced by isoflavones were triggered by the twofold effects observed previously. To our knowledge, a single metabolomic study on soy isoflavones has been made so far, comparing the endometabolome profiles of a non-tumorigenic epithelial breast cell line and a breast cancer cell line exposed to 17- β -estradiol, genistein or a native root flax extract. Therefore, our research is the first one to tackle both extracellular and intracellular metabolites, using two different breast cancer cell lines, an estrogen responsive one and an estrogen non-responsive one. It is offering a comprehensive overview of the metabolic alterations induced by isoflavones in breast cancer cells.

After his PhD dissertation, the author published 38 scientific papers (22 ISI - 11 as first author, 16 BDI) in the above-mentioned fields in very important scientific journals (e.g. Proteomics (Q1), Journal of Proteomics (Q1), Clinica Chimica Acta (Q1), Pharmaceutics (Q1), Molecules (Q2), International Journal of Molecular Sciences (Q2). Also, Mrs. Cristina-Adela Iuga published two books (first author), two books (co-author) and seven chapters in national books.

In the same period, the author coordinated as principal investigator (PI) one grant and participated as member in nine national grants obtained by competition.

Her future scientific activities will focus on:

- ✓ the development of new ultrasensitive techniques for drug development and quality control of pharmaceuticals and biopharmaceuticals industry;
- ✓ the discovery and validation of new panels of protein biomarkers with clinical relevance in cancer diseases by proteomic tools;
- ✓ the discovery and validation of metabolic biomarkers with clinical relevance in cancer diseases by metabolomic tools;

In the same time, the didactic activities implying lectures and practical works in Pharmaceutical Analysis, Biological Drugs and Research Methodology will be continuously improved by adding new scientific aspects and/or new subjects of interest accordingly to the latest scientific developments in this field.