

## REZUMAT TEZĂ DE ABILITARE

### **Abordări inovative și perspective în regenerarea tisulară. Metode avansate în evaluarea proceselor inflamatorii cronice. Biosenzorii salivari în practica medicală - premize și perspective**

**Conf. Dr. ARANKA ILEA**

Teza de abilitare cuprinde 3 capitole principale: cercetarea științifică, cariera academică și profesională desfășurată până în prezent, respectiv noile direcții de dezvoltare în aceste domenii. După susținerea tezei de doctorat cu titlul *"Factorii de risc în parezele și paralizii faciale periferice"* (în martie 2014), mi-am îndreptat atenția către cinci teme de cercetare în domeniul medicinei dentare:

1. Celulele stem mezenchimale în practica stomatologică
2. Stresul oxidativ, metainflamația și antioxidanții naturali în patologia cavității orale
3. Biosenzorii salivari
4. Modificările de volum gingival – etiologie și manifestări clinice
5. Particularitățile tratamentului stomatologic la pacienții cu afecțiuni asociate.

Cercetarea în domeniul proceselor regenerative utilizând celule stem mezenchimale le-am demarat în cadrul proiectului de tip Grant intern finanțat de UMF "Iuliu Hațieganu" în calitate de director al proiectului: *„Role of adipose-derived stem cells in bone regeneration in Swine"*, în perioada 2014-2016 (NR. 1491/16/28.01.2014). Cercetarea s-a finalizat cu depunerea brevetului de invenție: *"Radăcină dentară artificială și procedeu de obținere a acesteia din acid polilactic greșat cu celule stem mezenchimale"* - nr. OSIM - A 00135/27.02.2019, (autori: Ilea A, Boșca AB, Sorițău O, Guțiu E, Câmpian RS), invenția fiind premiată cu Medalia de aur la The 11<sup>th</sup> Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation, 16-18 May 2019, Iași, Romania. Printarea 3D a unei biorădăcini dentare mi-a deschis orizonturile spre un nou domeniu al medicinei dentare regenerative prin câștigarea unui nou proiect de tip Grant intern finanțat de către UMF "Iuliu Hațieganu" în calitate de director al proiectului: *„Noi produse inovative realizate prin prototipare rapidă 3D utile în ingineria tisulară regenerativă din medicina dentară"*, derulat în perioada 2016-2018, (nr. 4944/8/08.03.2016). Astfel că în colaborare cu Universitatea Babeș Bolyai, Facultatea de Chimie și UTCN am testat biocompatibilitatea *in vitro* și *in vivo* matricilor de Titan realizate prin topire selectivă cu laser și am studiat modul în care dimensiunile ochiurilor matricei influențează osteointegrarea acestora. Rezultatele obținute au fost premiate cu Medalia de Aur la Salonul Internațional de Invenții și Inovații "Traian Vuia", 7-9 Iunie, 2017, Timișoara, România pentru lucrarea *"Innovative new products made by SLM (Selective Laser Melting) useful in bone tissue engineering"*, autori - Ilea A, et al. Pentru a putea observa în timp real procesele de regenerare tisulară am propus realizarea unui sistem de microscopie *in vivo*, *"Real-time microscopy on 3D printed structures - method for diagnosis and therapeutic intervention useful in tissue engineering"*, ideea de proiect fiind premiată cu Medalia de aur la The 22<sup>nd</sup> International Conference of Inventics – INVENTICA 2018, 28-29 June 2018, Iași, Romania - Ilea A, et al. De asemenea m-a preocupat izolarea celulelor stem mezenchimale de la nivelul cavității orale (cu diferite origini: folicul dentar, pulpă dentară, papilă apicală, ligament parodontal, țesut gingival, țesut osos tuberozitar și interadicular) și utilizarea lor în domeniul ingineriei tisulare. Viitoarele direcții de dezvoltare în domeniul ingineriei tisulare vor fi legate de medicina personalizată pentru fiecare pacient în parte, utilizarea celulelor stem autologe și

controlarea proceselor de regenerare. Acest deziderat va putea fi atins prin printarea 3D a viitoarelor fragmente de țesuturi vii sau organe viabile, cu posibilitatea de a printa în straturi diferite atât a sistemului matriceal cu factori de creștere cu eliberare secvențială, concomitent cu printarea 3D și a celulelor stem. O altă direcție de dezvoltare o reprezintă evaluarea în timp real a proceselor de regenerare tisulară. Histologia minim invazivă "live" va permite achiziționarea de informații continue în timp real, astfel crescând acuratețea diagnosticului, evidențierea unor procese biologice în dinamică sau aspecte ne-elucidate până în prezent. Un alt avantaj îl va reprezenta posibilitatea administrării locale a produselor farmaceutice, la momentul oportun, titrarea dozelor în funcție de rezultatele obținute în timp real, în etapa biochimică a bolii și înainte de apariția simptomatologiei. A treia direcție de dezvoltare în domeniul celulelor stem o reprezintă implicarea lor în diversele procese patologice, cum este și carcinogeneza. Celulele stem canceroase (CSCs) sunt celule stem cu proprietăți tumorigene care sunt capabile să ducă la apariția tuturor tipurilor de celule prezente într-o tumoare. Dezvoltarea de terapii inovatoare cu acțiune țintită spre CSCs ar putea îmbunătăți rata de supraviețuire și calitatea vieții pentru pacienții cu cancer. Controlând multiplicarea celulelor stem canceroase probabil că vom putea contribui la reducerea riscului de metastazare și recidivă.

Stresul oxidativ l-am evaluat în boala parodontală indusă pe model animal, iar mai apoi am testat efectul antioxidanților naturali. În acest sens am propus metode avansate de tratament al bolii parodontale, ideea de proiect fiind premiată cu Medalia de aur la The 22<sup>nd</sup> International Conference of Inventics – INVENTICA 2018, 28-29 June 2018, Iași, Romania pentru lucrarea "*Clinical efficacy of a mucoadhesive nanoparticulate gel based on antibiotics, anti-inflammatory drugs and anthocyanins used in the periodontal treatment*", autori: Boșca AB, Dinte E, Ilea A, et al. O altă abordare a reprezentat-o administrarea antioxidanților naturali prin utilizarea lipozomilor ca vehiculi, ideea de proiect fiind premiată cu Medalia de argint pentru lucrarea "*Advanced drug delivery systems of curcumin and epigallocatechine-gallate and novel curcumin analogs for increased bioavailability in human periodontal stem cells*" în cadrul Salonului Internațional de Invenții și Inovații "Traian Vuia", 7-9 Iunie, 2017, Timișoara, România. Boșca AB, Ilea A, et al.

Evaluarea inflamației cronice de intensitate joasă (metainflamația) se poate realiza din diferite biofluide ale organismului, iar cel mai accesibil biofluid este saliva. În acest sens, în cadrul proiectului COFUND-ERA-HDHL ERANET, Cooperarea Europeană și Internațională - Subprogram 3.2 - Orizont 2020, Programul PNCDI III - Biomarkers for Nutrition and Health. "*Innovative Technological Approaches for validation of Salivary AGEs as novel biomarkers in evaluation of risk factors in diet-related diseases*" - SALIVAGES. P1-UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca – director proiect: Ilea A, nr. 25/1.09.2017 aflat în curs de derulare (2017-2020) am dezvoltat împreună cu echipa de cercetare de la Facultatea de Farmacie (Disciplina Chimie Analitică) și UTCN mai multe prototipuri de biosenzori salivari: senzor optic pentru detecția sângelui în saliva artificială, senzor electrochimic pentru evaluarea *N-epsilon (Carboximetil)lizinei* și un biosenzor salivar dezvoltat pentru detecția *Pseudomonas aeruginosa* prin factorii de virulență. Rezultatele obținute ne-au permis depunerea unei cereri de brevet de invenție cu titlul: "Senzor optic salivar realizat prin cuplarea laterală a unei fibre optice cu emisie pe suprafață și a unei fibre optice fluorescente integrat într-un dispozitiv intra-oral" - nr. OSIM A 00136/27.02.2019, autori: Faragó P, Gălățuș RV, Groza RG, Băbțan AM, Feurdean CN, Petrescu BN, Boșca AB, Ilea A. Rezultatele obținute în laborator prin testarea diferitelor prototipuri de senzori optici și electrochimici trebuie transformate în dispozitive medicale, portabile de către pacienți în activitățile curente, cu posibilitatea de a furniza rezultate fiabile și în timp real, informații transmise către un dispozitiv de înmagazinare și procesare a datelor, cu sisteme de tip

alert (pentru pacient și medic), transmisia fiind fără fir (wireless), cu scop diagnostic sau/și terapeutic. Astfel, biosenzorul trebuie să fie capabil să detecteze intervenția terapeutică. Ca metodă de integrare a biosenzorului, o provocare o reprezintă miniaturizarea componentelor astfel încât să fie atașate sau integrate în lucrările protetice uzuale sau chiar într-o obturație coronară. Un deziderat pentru cercetările viitoare poate să-l reprezinte printarea senzorului electrochimic direct pe suprafața dentară, sub forma unui tatuaj dentar. În cercetările viitoare va trebui să găsim răspunsuri la modalitatea de printare și de colectare a datelor. O altă provocare o reprezintă detecția indirectă a metainflamației prin evaluarea efectelor la nivel tegumentar și mucozal al produșilor finali de glicozilare avansată (AGEs) prin metode imagistice non-invazive precum este și examinarea ultrasonografică.

Cercetările pe care le-am efectuat s-au îndreptat și spre modificările de volum gingival induse medicamentos prin acțiunea blocantelor canalelor de calciu, cele de origine virală determinate de infecția cu virusul papilloma uman (HPV) și cele întâlnite în granuloamele periferice cu celule gigante. Prin formarea mea profesională și în domeniul medicinei generale, am fost preocupată de corelația dintre afecțiunile orale și cele generale, respectiv de riscurile pacientului cu diferite comorbidități în cabinetul stomatologic. Astfel că am abordat următoarele teme: riscul unui eveniment cardiovascular acut la pacienții cu procese inflamatorii cronice localizate la nivelul cavității orale, riscurile în cabinetul stomatologic ale pacientului aflat sub tratament de durată cu anticoagulatele orale clasice versus noile anticoagulate orale (NOACs), riscurile pacientului cu diabet zaharat în cabinetul stomatologic, tratamentele stomatologice în sarcină și în perioada de alăptare.

## **ABSTRACT OF HABILITATION THESIS**

### **Innovative approaches and perspectives in tissue regeneration. Advanced methods for the assessment of chronic inflammatory processes. Salivary biosensors in medical practice - premises and perspectives**

**Assoc. Prof. Dr. ARANKA ILEA**

The habilitation thesis consists of 3 main chapters: the scientific research, the academic and professional career conducted until now, and the new directions of development in these fields. After completing the Ph.D. thesis entitled "*Risk factors in paresis and peripheral facial paralysis*" (in March 2014), I turned my attention towards five research topics in the field of dental medicine:

1. Mesenchymal stem cells in dental practice
2. Oxidative stress, meta-inflammation and natural antioxidants in oral cavity pathology
3. Salivary biosensors
4. Gingival enlargement - etiology and clinical manifestations
5. Particularities of dental treatment in patients with associated conditions.

I started the research in regenerative processes using mesenchymal stem cells in the framework of the internal grant project financed by UMPH "Iuliu Hațieganu" as project manager: "*Role of adipose-derived stem cells in bone regeneration in swine*", conducted between 2014 and

2016 (No 1491/16 / 28.01.2014). The research was completed by recording the invention patent: "Artificial dental root and procedure for obtaining it from polylactic acid grafted with mesenchymal stem cells" - no. OSIM - A 00135 / 27.02.2019 (authors: Ilea A, Boşca AB, Sorițău O, Guțiu E, Câmpian RS), the invention being awarded by Gold Medal at The 11th Edition of EUROINVENT European Exhibition of Creativity and Innovation, 16-18 May 2019, Iași, Romania. The 3D printing of a dental bioroot has opened my horizons to a new field of regenerative dental medicine by winning a new internal grant project funded by Iuliu Hațieganu UMPH as project manager: "New innovative 3D prototype products useful in regenerative tissue engineering in dental medicine", conducted in the period 2016-2018, (No 4944/8 / 08.03.2016). Thus, in collaboration with Babeș Bolyai University, the Faculty of Chemistry and Technical University of Cluj-Napoca (TUCN), we tested the *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of the Titanium scaffolds made by selective laser melting and we studied how the size of the scaffold meshes influenced their osseointegration. The obtained results were awarded with Gold Medal at the International Exhibition of Inventions and Innovations "Traian Vuia", 7-9 June, 2017, Timișoara, Romania for the work "Innovative new products made by SLM (Selective Laser Melting) useful in bone tissue engineering", authors - Ilea A, et al. In order to be able to observe the tissue regeneration in real time, we proposed a device for *in vivo* microscopy - "Real-time microscopy on 3D printed structures - method for diagnosis and therapeutic intervention useful in tissue engineering", the project idea being awarded with the Gold Medal at the 22nd International Conference of Inventics - INVENTICA 2018, 28-29 June 2018, Iași, Romania - Ilea A, et al. I have also been concerned about the isolation of mesenchymal stem cells from the oral cavity (with different origins: dental follicle, dental pulp, apical papilla, periodontal ligament, gingival tissue, tuberosity and inter-radicular bone tissue) and their use in tissue engineering. Future development directions in the field of tissue engineering will be related to personalized medicine for each patient, the use of autologous stem cells and the control of regeneration processes. This will be achieved by 3D printing of future fragments of viable tissues or viable organs, with the ability to print in different layers both the matrix system and sequential release growth factors, along with 3D printing of stem cells. Another direction of development is the real-time evaluation of tissue regeneration processes. The minimally invasive live histology will allow the acquisition of continuous information in real time, thus increasing the accuracy of the diagnosis, highlighting biological processes in dynamics or aspects not elucidated at the present moment. Another advantage will be the possibility of local administration of pharmaceuticals at the appropriate moment, titration of the doses according to the results obtained in real time, during the biochemical stage of the disease and before the occurrence of the symptomatology. The third direction in the development of stem cells research is their involvement in various pathological processes, such as carcinogenesis. Cancer stem cells (CSCs) are tumor cells with tumorigenic properties that are capable of giving rise to all types of cells present in a tumor. The development of innovative therapies targeting CSCs could improve the survival rate and quality of life for cancer patients. Controlling the multiplication of cancer stem cells is likely to help reduce the risk of metastasis and recurrence.

Oxidative stress was evaluated in experimentally-induced periodontal disease in an animal model, and then we tested the effect of natural antioxidants. In this regard, we proposed advanced therapies in the periodontal disease, the idea being awarded the Gold Medal at the 22nd International Conference of Inventics - INVENTICA 2018, 28-29 June 2018, Iași, Romania for the work "Clinical efficacy of a mucoadhesive nanoparticulate gel based on antibiotics, anti-inflammatory drugs and anthocyanins used in periodontal treatment ", authors: Boşca AB, Dinte

E, Ilea A, et al. Another approach was the use of liposomes as vehicles for the natural antioxidants administration, the idea being awarded the Silver Medal for the work *"Advanced drug delivery systems of curcumin and epigallocatechine-gallate and novel curcumin analogues for increased bioavailability in human periodontal stem cells"* at the International Exhibition of Inventions and Innovations "Traian Vuia ", 7-9 June, 2017, Timișoara, Romania, authors: Boșca AB, Ilea A, et al.

The evaluation of chronic low level intensity inflammation (metainflammation) can be made using various body fluids, but the most accessible biofluid is saliva. In this respect, under the framework of COFUND-ERA-HDHL ERANET project, European and International Cooperation - Subprogram 3.2 - Horizon 2020, PNCDI III Program - Biomarkers for Nutrition and Health, *"Innovative Technological Approaches for Validation of Salivary AGEs as New Biomarkers in Evaluation of Risk Factors in Diet-Related Diseases"* – SALIVAGES, P1-UMPh "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, project manager: Ilea A, no. 25 / 1.09.2017 (2017-2020), we developed together with the research team from the Faculty of Pharmacy (Analytical Chemistry Discipline) and TUCN several prototypes of salivary biosensors: optical sensor for blood detection in artificial saliva, electrochemical sensor for the evaluation of N-epsilon (Carboxymethyl) lysine, and a salivary biosensor developed for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* by virulence factors. The results obtained allowed us to file a patent application entitled *"Salivary optical sensor implemented by the lateral coupling of a side-emitting optical fiber and a fluorescent optical fiber integrated into an intra-oral device"* - no. OSIM A 00136 / 27.02.2019, authors: Faragó P, Gălătuș RV, Groza RG, Băbțan AM, Feurdean CN, Petrescu BN, Boșca AB, Ilea A. The results obtained in the laboratory by testing various prototypes of optical and electrochemical sensors could be transformed into medical devices, wearable by patients in current activities, with the ability to provide reliable and real-time results, information transmitted to a data storage and processing device, with alert systems (for both the patient and the physician), wireless transmission, for diagnostic and/or therapeutic purposes. Thus, the biosensor must be capable to detect the therapeutic intervention. As a method for biosensor integration, a big challenge is to miniaturize the components so they could be attached or integrated into normal prosthetic works or even in a tooth filling. A goal for future research may be to print the electrochemical sensor directly on the dental surface, such as a dental tattoo. In future research, we will try to find answers to how we print and collect data. Another challenge is the indirect detection of meta-inflammation by assessing the effects on the skin and mucosa of advanced glycation end products (AGEs) by non-invasive imaging methods, such as ultrasound examination.

The research that I performed also focused on drug-induced gingival overgrowth due to the calcium channel blockers, those of viral origin caused by human papilloma virus infection (HPV) and those encountered in peripheral giant cell granulomas. Given my professional training in general medicine, I have been concerned about the correlation between the oral and general diseases, respectively the risks of the patient with various comorbidities in the dental office. So, I approached the following topics: the risk of an acute cardiovascular event in patients with chronic inflammatory processes located in the oral cavity, the risks in the dental office of the patient under long-term classical oral anticoagulants versus new oral anticoagulants (NOACs), the risks of the patient with diabetes mellitus in the dental office, the dental treatments in pregnant women and during the lactation period.