

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU
HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**



**NANOTERAPIA ÎN CANCERUL DE PANCREAS: MODELE
EXPERIMENTALE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT ÎN VEDEREA OBTINERII TITLULUI
ȘTIINȚIFIC DE DOCTOR ÎN ȘTIINȚE MEDICALE**

**DOCTORAND
LUCIAN MOCAN**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. VLAD LIVIU**

2011

Cuprins

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	4
Capitolul I. Studiu teoretic privind receptorii membranari specifici celulelor tumorale pancreatice în scopul utilizării ca target de internalizare intracelulară a nanotuburilor de carbon biofuncționalizate.....	5
1. Introducere	5
2. Receptorul factorului de creștere fibroblastic și liganzii săi.....	7
3. Receptorul GP 60 și liganzii săi.....	7
Capitolul II: Studiul bio-nanosistemelor pe bază de nanotuburi de carbon cu rol în terapia termo-ablativă a cancerelor:.....	9
1. Introducere	9
2. Protocoale standard de funcționalizare a nanotuburilor de carbon cu compuși organici:	12
Capitolul III: Studiu teoretic asupra citotoxicității CNTs.	17
Capitolul IV: Studiul fenomenelor de nanofototermoliză celulară.....	18
Capitolul V: Studiu teoretic privind căile de administrare a compușilor pe bază de nanotuburi de carbon în vivo.	21
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	24
Capitolul I: Bioligand funcționalizarea nanotuburilor de carbon cu albumină serică umană.....	25
1. Introducere	25
2. Material și metode.....	25
3. Rezultate:	
a. Oxidarea MWCNTs.....	25
b. Conjugarea HSA cu FITC.....	26
c. Optimizarea condițiilor de oxidare a MWCNTs.....	27
d. Optimizarea funcționalizării necovalente cu HSA-FITC	32
3. Discuții și concluzii.....	33
Capitolul II: Nanofototermoliza in vitro laser mediată de nanotuburi de carbon funcționalizate cu albumină serică umană pe culturi celulare PANC-1.....	35
1. Material și Metode	35
2. Rezultate	41
3. Discuții și concluzii.....	56
Capitolul III: Urmărirea efectelor citotoxice ale culturilor celulare seriate în contact cu suspensii de nanotuburi de carbon tip multi walled.....	59

1. Material și Metode	59
2. Rezultate și Discuții	63
3. Concluzii	65
Capitolul IV: Nanofototermoliza laser in vivo mediată de HSA-MWCNTs pe soareci CD 1 imunosupresați	66
1. Imunosupresia șoarecilor CD1 scopul xenotransplantării	66
2. Realizarea transplantului ortotopic de cancer pancreatic uman.....	73
3. Evaluarea modelului	79
4. Administrarea suspensiei de HSA-MWCNTs la șoarecii cu adenocarcinom pancreatic uman	81
5. Iradierea laser și evaluarea imunohistochemică a tratamentului	85
Capitolul V: Dezvoltarea și validarea unei platforme biologice de cancer pancreatic uman pentru testarea ex vivo a modelului de nanofototermoliză LASER mediat de nanotuburi de carbon funcționalizate cu albumin serică umană.	87
1. Introducere	87
2. Material și metode.....	88
a. Prelevarea cancerului pancreatic.....	88
b. Conservarea pancreasului	88
c. Iradierea LASER.....	89
d. Colorarea și vizualizarea imagistică a țesutului.....	90
3. Rezultate	91
a. Internalizarea nanotuburilor de carbon.....	91
b. Spectroscopia Raman a țesutului.....	92
c. Citotoxicitatea indusă de iradierea laser sau administrarea de HSA – MWCNTs.	94
d. Evaluarea necrozei tumorale după tratamentul laser și administrarea albuminei serice umane (HSA) și a nanotuburilor de carbon cu pereți multipli (MWCNTS).	94
e. Testul TUNEL	97
4. Discuții și concluzii.....	98
VI. Bibliografie:.....	101

Scopul principal al cercetării a fost acela de a genera o metodă nouă, specifică de tratament a cancerului pancreatic. Datele preliminare din literatură susțin implicarea albuminei în creșterea tumorală. Ipoteza de cercetare este aceea că este aceea că albumina stimulează dezvoltarea propriu-zisă tumorală fiind utilizată în sinteza diverselor compartimente celulare.

Pentru investigarea efectelor citotoxice ale produsului nanoconjugat, liniile celulare PANC-1 și CRL-4020 cu fost expuse și incubate la concentrații și timpi de expunere diferiți. Similar cu alte studii, rezultatele cercetărilor noastre au arătat că numai nivele ridicate de concentrație a HSA-CNT prezintă efecte citotoxice. Totuși, prezența unei astfel de toxicități impune limitări ale aplicațiilor terapeutice bazate pe CNT și poate fi controlată prin administrarea de doze scăzute de compuși pe bază de nanotuburi.

În continuare, cercetarea a utilizat albumina serică umană legată non-covalent de nanotuburi de carbon (HSA-CNT) ca agenți inductori de energie termică sub iradiere LASER în timpul procesului de nanofototermoliză. Acest proces este bazat pe prezența și aglomerarea HSA-CNT în celule și absorbția optică ridicată. Aceasta este responsabil pentru inducerea de efecte termice, în special în domeniul infraroșu (IR) în care este cunoscută transparența sistemelor vii pentru radiație. Tranzițiile optoelectronice în structurile grafitice ale aglomerărilor de CNT generează energie termală care difuzează rapid în structurile sub-celulare în care compușii nanoconjugați sunt prezenți.

Ablația termică a celulelor canceroase marcate cu HSA-CNT indusă prin iradiere LASER poate fi utilizată în două moduri: pulsant și continuu. Modul pulsant produce distrucții localizate (câțiva mm), date de afectarea celulelor individuale marcate prin formarea de micro- și nano-bule ca urmare a iradierii LASER. În această variantă de iradiere țesutul înconjurător nu este afectat. Metoda este în mod special utilă în cazul în care se intenționează distrugerea în vivo a unor celule individuale. Modul continuu este mult mai consumator de timp și energie (câteva minute de expunere) și induce denaturare termică și coagulare. Din acest motiv este mai util pentru cazurile în care se dorește distrugerea tumorilor primare cu dimensiuni de câțiva mm sau mai mari.

Utilizând iradiere LASER de tip continuu am obținut diferențe în procentul celulelor maligne apoptotice post iradiere LASER ($p < 0.05$) pentru concentrații mai mici decât 20mg/L la 60 de secunde și 30 minute comparativ cu ratele apoptotice ale CRL 4020. Aceste rezultate sunt în mod special importante pentru eșantioanele în care HSA-CNTs au fost prezente în concentrații

reduse (ex: nivele plasmatice după administrare intra-arterială). După cunoștința noastră, acestea sunt primele rezultate raportate în literatură în care se prezintă efectele iradierii LASER asupra celulelor pancreatice maligne marcate cu HSA-CNTs.

S-a afirmat că mecanismul de internalizare al albuminei de către celulele PANC-1 este endocitoza caveolae dependentă, mecanism similar cu cel implicat în alte tipuri de liganzi precum colesterolul și acidul folic. Mecanismul reprezintă o formă distinct de transport și prezintă caracteristici diferite de cele ale endocitozei clatrin-dependentă.

După internalizarea în caveole, biomaterialele sunt acumulate în caveosomi, un tip specific de organite celulare. Până în prezent acidul folic a fost intens studiat pentru potențialul său de utilizare ca bază pentru terapiile țintite molecular. Rezultate semnificative s-au obținut în cazul utilizării PEG (polietilen glicol) funcționalizat cu folat pentru țintirea receptorilor specifici (receptori de folat).

În domeniul chimioterapiei, mecanismele de transport mediate de caveolină au fost deja larg explorate pentru chimioterapii țintite. Această cale de internalizare a fost preferată pentru că utilizează un mecanism non-degradativ, cu eliberarea chimioterapicului în funcție de PH-ul soluției. De exemplu, o combinație de citostatic cu albumină cunoscută sub denumirea comercială de Trexall este în prezent utilizată pentru tratamentul cancerului pancreatic metastatic la om. Literatura a sugerat deja idei noi de terapii țintite care să evite degradarea lizozomală. Acestea sunt capabile să ofere un nivel de protecție ridicat pentru componentele terapeutice. Un receptor specific endotelial asociat cu mecanismele de internalizare menționate este receptorul albondină (gp60).

Concordant cu rezultatele menționate mai sus am demonstrat că mecanismul de internalizare HSA-CNT în celulele pancreatice este o endocitoză caveole-dependentă inițiată de legarea albuminei de receptorul gp60.

Am observat că tratarea celulelor PANC-1 cu concentrații ridicate de HSA-CNT pentru un interval mai mare decât 5 ore, procentul celulelor apoptotice PANC-1 nu diferă semnificativ de cel al celulelor epiteliale. Aceste rezultate sugerează o difuzie pasivă intracelulară a nanomaterialului în celulă în cazul expunerii la concentrații ridicate ale nanomaterialului pentru o perioadă lungă de timp.

Pentru comparație, intervalele de incubare mai reduse de 30 de minute au determinat liza celulară selectivă a celulelor PANC-1 tratate cu HSA-CNT, independente de concentrație. În

sistemele celulare asocierea/disocierea de membrane a elementelor reprezintă un proces rapid, cu durată de la câteva secunde la câteva minute. De aceea, rezultatele pot fi de o importanță decisivă în cazul utilizării HSA-CNT pentru terapiile antineoplazice țintite în vivo.

Rezultatele prezentate reprezintă un pas important în eliminarea celulelor neoplazice utilizând ablația termică indusă LASER țintită nanotehnologic. Totuși, cercetări suplimentare sunt necesare pentru înțelegerea completă a mecanismelor de legare selectivă a HSA-CNT.

Modelele animale de cancer uman sunt larg folosite în cancer în vederea testării experimentale a nanoparticulelor. În ciuda popularității lor aceste modele prezintă lipsuri majore deoarece celulele tumorale umane suferă un proces de transformare cinetică în urma transplantării și pasajului în șoareci nuzi astfel că majoritatea tumorilor umane xenogrefate nu păstrează caracteristicile morfologice și biochimice ale tumorii originale. Totuși, această discrepanță între a testa noi terapii anticanceroase pe oameni pe de o parte și pe modele animale sau pe celule pe de altă parte poate fi evitată folosind tehnici *ex vivo* de perfuzie a organelor rezecate chirurgical și transportate la rece.

Ipoteza noastră centrală a fost aceea că albumina va conduce MWCNTs în interiorul țesutului tumoral după perfuzie intraarterială. Pentru a testa această ipoteză am dezvoltat o platformă experimentală folosind specimene viabile rezecate de la pacienții la care s-a practicat tratament cu intenție curativă pentru cancerul pancreatic (CP).

În ciuda atractivității lor în nanomedicină condițiile testării *in vitro* nu pot reproduce întregul mediu biologic *in vivo* datorită variabilității acestuia (aciditate versus alcalinitate, diferențe în context cationic) și manifestă efecte limitate în legarea proteinelor de receptorii de pe suprafața celulelor. Mai mult, pentru experimentele *in vitro*, proprietățile nanoparticulelor cum ar fi: capacitate absorbtivă ridicată, hidrofobie, încărcătură de suprafață, proprietățile optice și magnetice sau activitatea catalitică pot fi alterate.

Pe de altă parte, un potențial minus în experimentele de nanofototermodiliză pe modele animale de cancer o constituie morfologia și dimensiunea tumorii, care sunt fundamental diferite de cele ale oamenilor. Astfel, toate particularitățile tumorii umane ca anatomia și distribuția vaselor, volumul și localizarea nu sunt comparabile cu modelul animal folosit în prezent.

Pentru a asigura succesul modelului nostru experimental de nanofototermodiliză sub aspecte clinice am dezvoltat un sistem *ex vivo* de adenocarcinom pancreatic uman. Considerăm

că, folosind acest sistem ca platformă de testare am putea depăși dificultățile întâlnite la modelele animale și simula perfect condițiile clinice reale.

Liza termică a țesutului malign după fototermoliză determină modificări în arhitectura histologică - modificări care pot fi detectate pe examinare histopatologică comună. Pentru a furniza indicii cu privire la eficacitatea soluției HSA-CNT în ablația termică a adenocarcinomului pancreatic, ne-am propus pentru să evaluăm histopatologic probele de țesut post-iradiere, obținute din mai multe regiuni din tumora vizibilă și din parenchimul din jur. Important, pentru cea mai mare a țesutului tumoral iradiat, examinarea microscopică în lumină a relevat contracția celulară, disocierea cu daune nucleare, edem și hemoragie. Descoperirile noastre histopatologice sunt în concordanță cu celelalte date din literatura care au studiat termoliza bazată pe nanotuburi de carbon în tumori solide.

Descoperiri similare au fost observate în urma analizei microscopice confocale. Rezultatele au confirmat modificările moleculare și celulare rezultate în urma necrozei indusă de laser, susținând în continuare datele descrise în literatura de specialitate. Dovezile sugerează că agresiunea termică bazată pe laser provoacă liza celulelor prin fragmentarea ADN-ului, generarea stresului oxidativ, pierderea de electroliți și osmoliți organice. În cele din urmă, proteinele sunt defalcate și celula se atrofiază în final și se dezintegrează în fragmente mici. Pe baza acestor date, demonstrăm că o liză selectivă a leziunilor pancreatice maligne ar putea fi obținută prin administrarea intravasculară de albumină umană legată de nanotuburi de carbon cu pereți multipli, combinată cu iradierea laser externă.

Pentru a investiga selectivitatea și eficacitatea tratamentului propus, a fost efectuată transferaza terminală "dUTP nick end labeling" (TUNEL), cu scopul de a colora nucleii necrotici ai celulelor apoptotice pe probele examinate. Semnul distinctiv al lizei celulelor este degradarea ADN-ului, care, în stadii incipiente, este selectivă la nivelul filamentelor de ADN internucleosomal. Fragmentarea ADN-ului poate produce lipsuri dublu-catenare și monocatenare ale ADN-ului (nick-uri). Ambele tipuri de pauze pot fi detectate prin etichetarea terminusului 3'-OH liber cu nucleotide modificate, cum ar fi fluoresceină-dUTP într-o reacție enzimatică. Enzima TDT (transferaza deoxinucleotidil terminală) catalizează polimerizarea a deoxiribonucleotidelor la 3'-end-ul ADN-ului monocatenar și dublu-catenar. Această metodă este recunoscută pentru sensibilitatea și specificitatea sa ridicată în detectarea celulelor apoptotice în țesut. Am furnizat dovezi imagistice conform cărora, mai mult de 95% din celulele tumorale au

fost apoptotice după iradiere. Pe de altă parte, rata apoptotică a celulelor înconjurătoare sănătoase a fost mai mică de 2% în cazul tuturor probelor examinate. Aceste observații sugerează natura specifică a tratamentului nostru și confirmă eficacitatea acestuia în inducerea apoptozei selective a adenocarcinomului pancreatic uman. Această distrugere selectivă a țesutului tumoral a confirmat, în plus, eficacitatea internalizării selective a nanotuburilor de carbon cu pereți multipli cu încărcătură de albumină serică umană, în interiorul adenocarcinomului ductal pancreatic.

În experimentul nostru, microscopia fluorescentă a identificat semne comune de liză termică a celulelor, dar nu și semne de carbonizare. S-a demonstrat că necroza de coagulare a celulelor maligne apare atunci când temperatura intracelulară este cuprinsă în intervalul 42°C - 44°C. Dacă vom diseca substratul molecular al mecanismului HSA-CNT mediat de ablație laser, vom obține o necroză selectivă a fiecărei celule maligne, la o scară micrometrică, urmată de o involuție volumetrică tumorală globală. Acest lucru este de o importanță decisivă, deoarece toate tehnicile actuale de ablație termică în chirurgie se bazează pe utilizarea de electrozi invazivi, care generează temperaturi locale ridicate (90°C), determinând carbonizarea non-selectivă a țesutului. Prin urmare, metode precum ablația prin radiofrecvență sau ecografie nu sunt folosite în chirurgia pancreatică (au aplicații limitate numai în tratamentul tumorilor ficatului și rinichiului. Datorită efectelor de ardere a țesutului, complicațiile acestor tehnici în practica chirurgicală, cum ar fi distrugerea amplă a țesutului normal și în cele din urma a organului, abcese reziduale, leziuni vasculare și hemoragie peritoneală, însămânțarea neoplazică și perforația intestinală sunt destul de comune.

Răspândirea celulelor pancreatice canceroase în circulația sistemică, urmată de însămânțarea în alte organe, proces numit metastază, este cauza celor mai multe decese cauzate de cancerul pancreatic. Astfel, dezvoltarea terapiilor cu țintă selectivă, capabile să distrugă aceste celule care circulă, ar putea deschide o nouă eră în tratamentul cancerului pancreatic. Prin urmare, există o nevoie imperioasă de astfel de inovații, de ``cai troieni`` moleculari, capabili să producă necroză sigură la nivel celular individual, cu efecte secundare minime.

CV Mocan Lucian

Data Nasterii: 28.05.1978

Educatie:

1984-1992-Scoala Generala, Campeni, judetul Alba

1992-1996-Liceul "Avram Iancu", Campeni, Alba.

1996-2000-Universitatea de Medicina and Farmacie "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca-diploma de doctor-medic

Experienta Profesionala:

01.01.2002-31.12.2003- Medic stagiar- Spitalul Clinic Judetean Cluj-Napoca

01.01.2004-31.12.2009- Medic rezident Chirurgie Generala-Spitalul Clinic de Urgenta" O Fodor" Cluj-Napoca-

01.07.2010-prezent-Doctorand Universitatea de Medicina si Farmacie" Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca

Participarea la proiecte de cercetare:

>> NANOHEP 42-115 Nanoterapia fototermică selectivă a hepatocarcinomului prin internalizare intracelulară și mecanism de activare Laser a nanotuburilor de carbon bio-ligand funcționalizate..
Director de proiect: Conf. Dr. C Iancu.

>> NANOPAN 41-009 Terapia tintita molecular a neoplasmului pancreatic prin excitarea optica rezonanta LASER a nanotuburilor de carbon functionalizate chimic si internalizate celular." Director proiect: Conf. Dr. Iancu Cornel

>>NANOCITOX 42-112 Evaluarea si modularea biodistributiei si citotoxicitatii nanotuburilor de carbon cu aplicatii biomoleculare Director proiect: Conf. Dr. Clichici Simona

Premii internationale:

1. **Queen Jadwiga (2004) distinction for young researchers Jagellonian University Cracow Poland**
2. **Joseph Dietl (2005) distinction at Jagellonian University Cracow Poland, for excellence in surgical oncology research.**

Publicatii in extenso in reviste cotate ISI (cu factor de impact):

- 1.Iancu C., **Mocan L.** Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia *International Journal of Nanomedicine* 2011, 6:1675-1684
- 2.**Mocan L** , Tabaran F, Mocan T, Bele C, Orza A, Lucan C, Stiufiuc R, Manaila I, Iulia F, Iancu D, Zaharie F, Osian G, Vlad L, Iancu C. Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine*. 2011, 6, 915-928.
- 3.Iancu C, **Mocan L**, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, Stiufiuc R, Stir A, Matea C, Iancu D, Agoston-Coldea L, Zaharie F, Mocan T. Enhanced laser thermal ablation for the in vitro

- treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. *Int J Nanomedicine*. 2011 Jan 17;6:129-41.
4. Mocan T, Clichici S, Agoșton-Coldea L, **Mocan L**, Șimon Ș, Ilie IR, Biriș AR, Mureșan A, Implication of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles. *Acta Phys. Hung*, 2010, 27(3), 247-255.
 5. Mocan T, Clichici S, Agoșton-Coldea L, **Mocan L**, Șimon Ș, Ilie IR, Biriș AR, Mureșan A, Dynamic effects over plasma redox balance following subcutaneous injection of single walled carbon nanotubes functionalized with single strand DNA. *Digest Journal of Nanomaterial and Biostructures*, 2011, (Under external review).
 6. Mahmood M, Karmakar A, Fejleh A, Mocan T, Iancu C, **Mocan L**, Iancu DT, Xu Y, Dervishi E, Li Z, Biriș AR, Agarwal R, Ali N, Galanzha EI, Biriș AS, Zharov VP. "Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of carbon nanotubes and anti-tumor drug" *Nanomedicine* 2009 Dec;4(8):883-93
 7. Mahmood M., Casciano D.A., Mocan T., Iancu C., Xu Y, **Mocan L**, Todea-Iancu D., Dervishi E., Li Z., Biriș AR, Abdalmuhsen M., Ali N., Biriș AS. "Cytotoxicity and Biological Effects of Functional Nanomaterials Delivered to Various Cell Lines": *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010 Jan;30(1):74-83.
 8. Iancu C, Ilie IR., Georgescu C, Ilie R, Biriș AR, Mocan T, **Mocan L**, Zaharie F, Todea-Iancu D., Susman S, Rus Ciuca D., Biriș AS. "Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the Onset of Nanomedicine". *Particulate Science and Technology*, 2009, 27(6) , 562 – 574.
 9. Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Mocan T, **Mocan L**. C677T and A1298C mutations in the MTHFR gene and survival in colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009 Dec;18(4):455-60.
 10. Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Cristea PG, Mocan T, **Mocan L**. NAT2 polymorphisms and sporadic colorectal cancer survival. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2010 Dec;19(4):361-8. PubMed PMID: 21188325.
 11. Ionescu D, Iancu C, Ion D, Al-Hajjar N, Margarit S, **Mocan L**, Mocan T, Deac D, Bodea R, Vasian H. Implementing fast-track protocol for colorectal surgery: a prospective randomized clinical trial. *World Journal of Surgery*. 2009 Nov;33(11):2433-8.
 12. Iancu C, **Mocan LC**, Todea-Iancu D, Mocan T, Acalovschi I, Ionescu D, Zaharie FV, Osian G, Puia CI, Muntean V. Host-related predictive factors for anastomotic leakage following large bowel resections for colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis*. Sep;17(3):299-303.
 13. Zaharie F, Iancu C, Tanțău M, **Mocan L**, Bartoș A, Mihăileanu F, Iancu D, Tomuș C, Zaharie R, Vlad L. [Laparoscopic treatment of a large trichobezoar in the stomach with gastric perforation and abdominal wall abscess]. *Chirurgia (Bucur)*. 2010 Sep-Oct;105(5):713-6. Romanian. PubMed PMID: 21141102.
 14. Finta O, **Mocan L**, Vlad L. [The evaluation of enzymatic and biochemical changes in radiofrequency liver resections]. *Chirurgia (Bucur)*. 2010 Jul-Aug;105(4):493-9. Romanian. PubMed PMID: 20941971.

Capitole de carte publicate in edituri internationale:

1. Lucia Agoșton-Coldea, T. Mocan, **L. Mocan**. Apolipoproteins A-I and B in risk evaluation for coronary heart disease. In JE Rathbond, Handbook of Lipoprotein Research. Nova Science Publishers, New York. 2010. pg. 5-32. ISBN 978-1-61668-186-9.

2. Iancu C, Ilie I, **Mocan L**, Georgescu C, Ilie R, Duncea I, Mocan T, Iancu D., Zaharie F. "Human Cord Blood-Derived Stem Cells in transplantation and regenerative medicine". In: "Stem Cells", InTech, 2011, In Press, ISBN: 978-953-307-232-6.

Patente:

1. **OSIM patent no.125476 A2/28.05.2010 Bele C., Matea C. T., Lupu D, Biriş A, Iancu C., Mocan L. Sulphamide extraction method in solid phase reaction mediated by multiwalled carbon nanotubes."**
2. **OSIM Pat.No.A/ 01134 Process for obtaining ultra short functionalized MWCNTs by controlled oxidation, Matea Cristian Tudor , Bele Constantin , Iancu Cornel , Mocan Lucian , Orza Anamaria-Ioana-**

Stagii de cercetare in strainatate:

1. **1.10-2004-12.2004: Queen Jadwiga Stipend at Jagellonian University Cracow Poland for the study of synchronous colo-rectal cancer**
2. **06.2005-.05-2006 Josef Dietl MA at Jagellonian University Cracow Poland**
3. **06.2006-09.2006 3 month Governomental scholarship (issued by Romanian Ministry of Education and Research) for the study of genetic alterations involved in synchronous colo-rectal cancer at Sahlgrenska Academy Goteborg, Sweden,**
4. **08-2008-10.2008: Specialization in the field of nanomaterials with applications in digestive oncology treatment in 2008 at Nanotechnology Department at ArkansasUniversity, USA.**

Prezentări orale la conferințe internaționale

L.Mocan. "Nanotherapy in pancreatic cancer, experimental models", cancer targeting by nanomaterials, Miami, Florida, 25-29 septembrie, 2008

L. Mocan. . Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes.4-th European Conference for Clinical Nanomedicine, 23-25 May, Basel Switzerland

L. Mocan , C. Iancu; C. Bele ; A. R. Biriş; T. Mocan , C. Catoi, F. A. Tabaran, R. Stiufiuc , S. Simon , C. Matea , Specific delivery of single wall carbon nanotubes by HSA functionalization and the corresponding enhanced thermal ablation for liver cancer destruction in vitro, 8th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, 3-5 Septembrie 2010, Stockholm, Suedia

Membru in organizatii profesionale:

- Societatea Română de Nanomedicină (membru fondator)

Societatea Europeana de Nanomedicina

**„IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
CLUJ-NAPOCA**



NANOTHERAPY OF PANCREATIC CANCER: EXPERIMENTAL MODELS

**THE SUMMARY OF THE THESIS FOR ACHIEVING THE TITLE OF
PH.D IN MEDICAL SCIENCES**

**PhD STUDENT
LUCIAN MOCAN**

**SCIENTIFIC COORDINATOR
PROF. DR. VLAD LIVIU**

2011

Table of Contents

CURRENT KNOWLEDGE IN THE FIELD	3
Chapter I: Review of the literature regarding the overexpression of certain receptors on the malign cell membranes with applicability in nano-photothermal ablation of pancreatic cancer	4
1. Introduction	4
2. Fibroblastic Growth Factor Receptor	6
3. Gp 60 Receptor	6
Chapter II: Current review of the literature regarding the latest nano-photothermal systems developed against malign tumors:	8
1. Introduction	8
2. Standard bio-functionalization protocols of carbon nanotubes for the selective targeting of human malign tumors	11
Chapter III: Cytotoxicity of carbon nanotubes: review.	16
Chapter IV: Nanophotothermal ablation of malign tumors: review.	17
Chapter V: The administration of nano-biosystems in living organisms: review.	20
PERSONAL CONTRIBUTIONS	23
Chapter I: Carbon nanotubes functionalization with human serum albumin	24
1. Introduction	24
2. Materials and Methods	24
3. Results:	
a. Carbon nanotubes oxidation	24
b. FITC labelling of albumin molecules	25
c. Non-covalent functionalization of CNTs with HSA-FITC C	31
4. Discussions and conclusions	32
Chapter II: In vitro nano-photothermal ablation of malign pancreatic cells (PANC 1	34
1. Materials and Methods	34
2. Results	40
3. Discussions and Conclusions	55
Chapter III: In vitro cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes	58
1. Materials and methods	58
2. Results and Discussions	62
3. Conclusions	64
Chapter IV: In vivo nano-mediated photothermal ablation on pancreatic cancer xenografts in mice	65

1. Imunosupression of CD 1 mice	65
2. Inoculation of human pancreatic cancer tissue in CD1 mice	72
3. Validation of the xenograft model.....	78
4. HSA-MWCNTs administration in mice.....	80
5. LASER irradiation of the HSA-MWCNTs treated mice	84
Chapter V: Ex vivo biological platform development for nano-mediated LASER ablation of human pancreatic cancer.....	87
1. Introduction	87
2. Materials and methods	88
a. Harvesting of Human Pancreatic tumor	88
b. Pancreas preservation.....	88
c. LASER irradiation.	89
d. Tissue imaging	90
3. Results.....	91
a. Carbon nanotubes internalization inside tumor.	91
b. Raman spectroscopy of the tissue.....	92
c. Tissue toxicity following ex vivo administration or irradiation.....	94
d. Validation of ex photothermal ablation pancreatic cancer mediated by HSA- MWCNTs.....	94
e. TUNEL assay	97
4. Discussions and Conclusions	98
VI. Bibliography:.....	101

Keywords: carbon nanotubes, pancreatic cancer, albumin functionalization, photothermal ablation

Summary:

The main goal of this investigation was to develop and test a new method of treatment of human pancreatic cancer. Preliminary data from literature supports the involvement of albumin in tumor growth. The implication is supported by the fact that albumin enhances tumor expansion as it is used for synthesis in various cellular compartments.

In order to investigate the toxicity effects of the nanoconjugates, PANC-1 cells and CRL-4020 epithelial cells were exposed and incubated with HSA-MWCNTs at various concentrations and incubation times, as to evaluate the possible cytotoxic effects. Consistent with other findings, we demonstrate that only high concentrations of MWCNTs bioconjugate exhibit cytotoxic effects. Nevertheless, the toxicity, that represents a major obstacle in using carbon nanotubes in clinical applications, may be minimized by administration of low dose levels of nanoconjugates.

Further, we used HSA-MWCNTs as heat inducing agents under laser radiation, during the process of nanophotothermolysis. This method is based on the presence and clustering of HSA-MWCNTs inside the cells, and their highly optical absorption capabilities, responsible for inducing thermal effects especially under NIR irradiation, where the biological systems have low absorption and high transparency. The optoelectronic transitions in the graphitic structures of the MWCNTs clusters generate thermal energy that rapidly diffuses into the subcellular compartments, where the nanoconjugates are present.

Laser induced thermal ablation of cancer cells labeled with HSA-MWCNTs may be used in two main modes: pulsed and continuous. The pulsed mode produces localized (few μm) damage of individual cancer cells by laser-induced micro- and nanobubbles around overheated nanoparticles without harmful effects on the surrounding healthy cells. It particularly favors in vivo killing of single circulating tumor cells using just one nanosecond laser pulses. The second mode is more time consuming (a few minutes of exposure) and results in the effects of thermal denaturation and coagulation as main mechanisms of cell damage. It is more appropriate for the treatment of primary tumors measuring a few or more mm.

The use of continuous laser irradiation proved significant differences in PANC-1 postirradiation apoptotic percentage ($p < 0.05$) for concentrations of less than 20 mg/L, at 60 seconds and 30 minutes, compared to the apoptotic rate of CRL-4020. This finding may be particularly relevant in case of low concentrations of HSA-MWCNTs (e.g. plasma levels after

intraarterial administration). It has been previously stated that the mechanism of HepG2 uptake for albumin is a caveolae-dependent endocytosis, similar to other types of ligands like the cholesterol or the folic acid. The mechanism represents a distinct form of transport and elicits different features than independent or clathrin-mediated endocytosis. After internalization of caveolae, the biomaterials are accumulated in caveosomes, a specific type of organelles. Up to date, the folic acid has been intensely studied for its potential in targeted therapies. Significant results were obtained after binding folate-functionalized poly (ethylene glycol) PEG coated nanoparticles to the targeted receptor (folate receptor). Within the field of chemotherapy, caveolae-mediated transport mechanisms have been largely used for targeted drug delivery. The pathway has been preferred as it was demonstrated to be a non-degradative mechanism using pH-dependant chemotherapy release. For instance, a combination of cytostatic drugs and albumin called Trexall is currently prescribed for the treatment of metastatic liver cancer in humans. The literature has already suggested new ideas of targeted therapies that could elude lysosomal harmful transit and will therefore offer a higher protection level for drug compounds. A specific endothelin receptor associated with the described uptake mechanism is the gp60 receptor (albondin). Using contrast phase, confocal and transmission electron microscopy, we demonstrated here without precedent that the mechanism of HSA-MWCNTs uptake in PANC-1 cells occurs through caveolae-dependent endocytosis initiated by the albumin binding gp60 receptor (albondin).

In the present study, we observed that within the treatment of PANC-1 cells with high concentrations of HSA-MWCNTs for more than 5 hours, the percentage of necrotic PANC-1 cells is not significantly different than that of epithelial cells. This finding suggests a non-selective, passive intracellular diffusion of nanomaterial inside the cells, when the cells are exposed to high concentrations of nanomaterials for long periods of time.

In contrast, we obtained a selective lysis of HepG2 cells treated with HSA-MWCNTs, for incubation periods shorter than 30 minutes, no matter the concentration. In cellular systems, the molecular membrane association/dissociation processes are of very short period ranging from seconds to minutes. Therefore, our finding could be of decisive importance when using HSA-MWCNTs for the in vivo targeting of pancreatic cancer cells.

We have developed a method of functionalization of carbon nanotube with human albumin for the selective targeting of liver cancer cells. Moreover, to our knowledge, this is the

first proof of improved selective thermal ablation of liver cancer cells using HSA-MWCNTs, compared to the normal, epithelial cells. Based on the presented results, we believe that HSA-MWCNTs selectively attach to albumin (aka gp60) receptor located on HepG2 cells' membrane, followed by an uptake through a caveolin-dependent endocytosis process. These results may represent a first step in the process of complete in vivo elimination of the pancreatic cancer cells using nanolocalized thermal ablation by means of laser heating. However, further research is required to fully understand the mechanisms of selective binding of HSA-MWCNTs in malignant cells. Nevertheless, further investigations are also required for the careful assessment of unexpected toxicities and biological interactions of HSA-MWCNTs inside the living organism.

Animal models of human cancer have been widely used for testing experimental cancer nanotherapies. Despite their popularity, these models exhibit major flaws because human tumor cells undergo kinetic changes after transplantation, and passage in the nude mice and the majority of the xenografted human tumors do not maintain the morphological and biochemical characteristics of the original tumors. Therefore, this methodological gap between testing new cancer therapies in humans, on the one hand, and animal models, on the other hand, can be avoided using ex vivo perfusion techniques of surgically resected organs under cold storage.

The central hypothesis of the study was that albumin will carry the MWCNTs inside the tumor tissue after intra-arterial perfusion. To test this hypothesis, we have developed an experimental platform using viable resected specimens from patients who underwent curative treatment of PC. Despite their attractiveness in nanomedicine, the in vitro test conditions cannot duplicate the host environment due to the variability of the testing media (e.g. acidic versus alkaline, differences in cation content), and exhibit limiting effect of protein binding on cell surface receptors. Moreover, the controlled conditions present in the in vitro biosystems are significantly different from those in vivo and properties of nanoparticles such as: high adsorption capacity, hydrophobicity, surface charge, optical and magnetic properties, or catalytic activity, may be modified. On the other hand, obvious potential pitfalls of nanophotothermolysis experiments on mice models are represented by the morphology and size of the tumor, which are fundamentally different than that of human tumors. Thus, all the particularities of human tumors such as vessels' anatomy and distribution, volume and location, are not comparable to these models.

Considering these data and the important role of albumin in tumor metabolism, we have used human albumin bound to multi-walled carbon nanotubes for the selective targeting of PC cells. Since ethical limitations made the selectivity and therapeutic potential of these nanocompounds in patients impossible to test, we have designed an original model of living PC. We used ex vivo-perfused pancreatic specimens that have been surgically removed from patients with ductal adenocarcinoma. On this model, the intra-arterial administration of albumin conjugated with MWCNTs specifically induced the release of this nanobioconjugate inside the malign tissue via the “capillary bed”. We present herein data suggesting that extensive and selective tumoral necrosis was obtained when the living pancreas underwent laser irradiation after the administration of HSA-MWCNTs via the greater pancreatic artery.

The ability of FITC-labeled bioconjugate of HSA-MWCNTs to internalize inside the tumor cells after administration via vascular supply has been assessed by confocal fluorescence and electron microscopy imaging. The area with the highest concentration of HSA-MWCNTs was observed in the central part of the tumor, where most of the malignant cells were stained with fluorescent dye. The malignant tissue extracted from the periphery of the tumor also presented intracytoplasmic MWCNTs-HSA-FITC. However, a lower density of fluorescent nanotubes was noted compared to the central region of the tumor. No fluorescence was observed outside the tumor, in the surrounding healthy parenchyma. Thus, we have provided imaging evidence that HSA can act as delivery carrier of MWCNTs, and because we were unable to identify any fluorescence in the healthy pancreatic tissue, we reasoned that the HSA-MWCNTs bioconjugates exhibit 100% affinity for ductal adenocarcinoma cells. These data support, on the one hand the involvement of the vascular architecture of the malignant lesion tributary to pancreatic magna artery and on the other hand the specificity of human serum albumin for cell receptors in the selective internalization of HSA-MWCNTs.

Moreover, electron microscopy of the tissue after treatment showed necrotic features with disintegrated nuclei, and intracellular clusters of MWCNTs, suggesting the efficacy of nano-photo-thermal ablation.

To investigate the selectivity and efficacy of the proposed treatment, terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed in order to stain the necrotic nuclei of apoptotic cells on the examined slides. Based on this method, we obtained strong imaging evidence that more than 95% of the tumor cells were apoptotic after the irradiation. On the other

hand, the apoptotic rate of the surrounding healthy cells was less than 2% on all the examined slides ($p < 0.0001$). These observations strongly suggest the specific nature of our treatment and confirmed its efficacy in inducing selective apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma.

The hallmark of cell lysis is represented by DNA degradation, which in early stages is selective to the internucleosomal DNA linker regions. The DNA cleavage may yield double-stranded and single-stranded DNA breaks (nicks). Both types of breaks can be detected by labeling the free 3'-OH termini with modified nucleotides such as fluorescein-dUTP in an enzymatic reaction. The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) catalyzes the template-independent polymerization of deoxyribonucleotides to the 3'-end of single- and double-stranded DNA. This method is recognized for its high sensitivity and specificity for apoptotic cell detection in tissue sections.⁴⁰ This selective destruction of the tumor tissue has additionally confirmed the efficacy of the selective internalization of MWCNTs, with HSA cargo, inside the ductal pancreatic adenocarcinoma after intra-arterial perfusion.

If we dissect the molecular detail of the HSA-MWCNTs mediated laser ablation mechanism, we obtain a selective necrosis of each malignant cell at a micrometric scale, with consequent global tumor involution. This is of decisive importance since all the current thermal ablation techniques in surgery rely on the use of invasive electrodes that generate high local temperature (90°C), with non-selective carbonization of the tissue. Therefore, methods such as radiofrequency or ultrasound ablation are not used in pancreatic surgery (they have limited applications in liver and kidney tumor treatment). Due to the burning effects on the tissue, complications of these techniques in surgical practice, such as the extensive destruction of normal tissue with organ failure, residual abscesses, vascular injuries and peritoneal haemorrhage, neoplastic seeding and intestinal perforation, are quite common.

The spread of pancreatic cancer cells in the systemic circulation, with consequent seeding in other organs, a process called metastasis, is the cause of most PC related deaths. Thus, the development of selective targeted therapies able to destroy these circulating cells could open a new era in the treatment of pancreatic cancer.

CV Mocan Lucian

Birth date: 28.05.1978,

Education, degrees and diplomas.

1984-1992 BSc Degree at “Avram Iancu” High-School Campeni

1992-1996 MD Degree University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, -

01.01.2004-31.12.2009 Resident Doctor in General Surgery , 3-rd Surgical Clinic

2007 – 2011 Enrolled as PhD student at University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca

2009 -Specialist Doctor in General Surgery

Project-based scientific and managerial experience connected to present proposal
: >> **Young Researcher (Team Member)** NANOHEP 42-115/2008: “Selective photothermal therapy of hepatocarcinoma by intracellular internalization and LASER activation mechanism of the carbon nanotubes functionalized with bio-ligands.”; >>**Young Researcher (Team Member)** NANOPAN 41-009/2007: “Molecular targeted therapy of the pancreatic neoplasm using LASER resonant optical excitation of the carbon nanotubes chemically functionalized and cellular internalized.”; >>**Young Researcher (Team Member)** NANOCITOX 42-112/2008:” Evaluation and modulation of the carbon nanotubes biodistribution and cytotoxicity with biomolecular applications(SWCNT-DNA; MWCNT-DNA).

International Distinctions:

1. Queen Jadwiga (2004) distinction for young researchers Jagellonian University Cracow Poland
2. Joseph Dietl (2005) distinction at Jagellonian University Cracow Poland, for excellence in surgical oncology research.

List of publications and patents:

A number of **23** articles published in ISI Web of Science-indexed journals (**impact factor ranging from: 0.56 up to 5.98**). **Total number of articles: 36** Most representative publications are listed below:

- 1.Iancu C., **Mocan L.** Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia **International Journal of Nanomedicine** 2011, 6:1675-1684
- 2.**Mocan L** , Tabaran F, Mocan T, Bele C, Orza A, Lucan C, Stiufiuc R, Manaila I, Iulia F, Iancu D, Zaharie F, Osian G, Vlad L, Iancu C. Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes. **Int J Nanomedicine**. 2011, 6, 915-928.
- 3.Iancu C, **Mocan L**, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, Stiufiuc R, Stir A, Matea C, Iancu D, Agoston-Coldea L, Zaharie F, Mocan T. Enhanced laser thermal ablation for the in vitro

- treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. **Int J Nanomedicine**. 2011 Jan 17;6:129-41.
4. Mocan T, Clichici S, Agoșton-Coldea L, **Mocan L**, Șimon Ș, Ilie IR, Biriș AR, Mureșan A, Implication of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles. **Acta Phys. Hung**, 2010, 27(3), 247-255.
 5. Mocan T, Clichici S, Agoșton-Coldea L, **Mocan L**, Șimon Ș, Ilie IR, Biriș AR, Mureșan A, Dynamic effects over plasma redox ballance following subcutaneous injection of single walled carbon nanotubes functionalized with single strand DNA. **Digest Journal of Nanomaterial and Biostructures**, 2011, (Under external review).
 6. Mahmood M, Karmakar A, Fejleh A, Mocan T, Iancu C, **Mocan L**, Iancu DT, Xu Y, Dervishi E, Li Z, Biriș AR, Agarwal R, Ali N, Galanzha EI, Biriș AS, Zharov VP. "Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of carbon nanotubes and anti-tumor drug" **Nanomedicine** 2009 Dec;4(8):883-93
 7. Mahmood M., Casciano D.A., Mocan T., Iancu C., Xu Y, **Mocan L**, Todea-Iancu D., Dervishi E., Li Z., Biriș AR, Abdalmuhsen M., Ali N., Biriș AS. "Cytotoxicity and Biological Effects of Functional Nanomaterials Delivered to Various Cell Lines": **Journal of Toxicology and Applied Pharmacology**, 2010 Jan;30(1):74-83.
 8. Iancu C, Ilie IR., Georgescu C, Ilie R, Biriș AR, Mocan T, **Mocan L**, Zaharie F, Todea-Iancu D., Susman S, Rus Ciuca D., Biriș AS. "Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the Onset of Nanomedicine". **Particulate Science and Technology**, 2009, 27(6) , 562 – 574.
 9. Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Mocan T, **Mocan L**. C677T and A1298C mutations in the MTHFR gene and survival in colorectal cancer. **J Gastrointestin Liver Dis**. 2009 Dec;18(4):455-60.
 10. Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Cristea PG, Mocan T, **Mocan L**. NAT2 polymorphisms and sporadic colorectal cancer survival. **J Gastrointestin Liver Dis**. 2010 Dec;19(4):361-8. PubMed PMID: 21188325.
 11. Ionescu D, Iancu C, Ion D, Al-Hajjar N, Margarit S, **Mocan L**, Mocan T, Deac D, Bodea R, Vasian H. Implementing fast-track protocol for colorectal surgery: a prospective randomized clinical trial. **World Journal of Surgery**. 2009 Nov;33(11):2433-8.
 12. Iancu C, **Mocan LC**, Todea-Iancu D, Mocan T, Acalovschi I, Ionescu D, Zaharie FV, Osian G, Puia CI, Muntean V. Host-related predictive factors for anastomotic leakage following large bowel resections for colorectal cancer. **J Gastrointestin Liver Dis**. Sep;17(3):299-303.
 13. Zaharie F, Iancu C, Tanțău M, **Mocan L**, Bartoș A, Mihăileanu F, Iancu D, Tomuș C, Zaharie R, Vlad L. [Laparoscopic treatment of a large trichobezoar in the stomach with gastric perforation and abdominal wall abscess]. *Chirurgia (Bucur)*. 2010 Sep-Oct;105(5):713-6. Romanian. PubMed PMID: 21141102.
 14. Finta O, **Mocan L**, Vlad L. [The evaluation of enzymatic and biochemical changes in radiofrequency liver resections]. *Chirurgia (Bucur)*. 2010 Jul-Aug;105(4):493-9. Romanian. PubMed PMID: 20941971.

B.1.3.2. International Book Chapters :

1. Lucia Agoșton-Coldea, T. Mocan, **L. Mocan**. Apolipoproteins A-I and B in risk evaluation for coronary heart disease. In JE Rathbond, Handbook of Lipoprotein Research. Nova Science Publishers, New York. 2010. pg. 5-32. ISBN 978-1-61668-186-9.

2. Iancu C, Ilie I, **Mocan L**, Georgescu C, Ilie R, Duncea I, Mocan T, Iancu D., Zaharie F. "Human Cord Blood-Derived Stem Cells in transplantation and regenerative medicine". In: "Stem Cells", InTech, 2011, In Press, ISBN: 978-953-307-232-6.

► **Patents:**

- 1 **OSIM patent no.125476 A2/28.05.2010** Bele C., Matea C. T., Lupu D, Biriş A, Iancu C., **Mocan L**. Sulphamide extraction method in solid phase reaction mediated by multiwalled carbon nanotubes.”.
- 2 **OSIM Pat.No.A/ 01134** Process for obtaining ultra short functionalized MWCNTs by controlled oxidation, Matea Cristian Tudor , Bele Constantin , Iancu Cornel , **Mocan Lucian** , Orza Anamaria-Ioana-

► **Abroad research training**

1. **1.10-2004-12.2004: Queen Jadwiga Stipend at Jagellonian University Cracow Poland for the study of synchronous colo-rectal cancer**
2. **06.2005-.05-2006 Josef Dietl MA at Jagellonian University Cracow Poland 06.2006-09.2006**
3. **3 month Governmental scholarship (issued by Romanian Ministry of Education and Research) for the study of genetic alterations involved in synchronous colo-rectal cancer at Sahlgrenska Academy Goteborg, Sweden,**
4. **08-2008-10.2008: Specialization in the field of nanomaterials with applications in digestive oncology treatment in 2008 at Nanotechnology Department at Arkansas University, USA.**

B.1.4. Hirsch index and the total number of citations, according to Web of Science: Hirsh Index: 3 Total number of citations:26

B.1.5. The address of the researcherid.com : <http://www.researcherid.com/rid/C-4123-2011>

► **Oral presentations at International Conferences:**

L.Mocan. “Nanotherapy in pancreatic cancer, experimental models”, cancer targeting by nanomaterials, miami, florida, 25-29 septembrie, 2008

L. Mocan. . Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes.4-th European Conference for Clinical Nanomedicine, 23-25 May, Basel Switzerland

L. Mocan , C. Iancu; C. Bele ; A. R. Biriş; T. Mocan , C. Catoi, F. A. Tabaran, R. Stiufiuc , S. Simon , C. Matea , Specific delivery of single wall carbon nanotubes by HSA functionalization and the corresponding enhanced thermal ablation for liver cancer destruction in vitro, 8th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, 3-5 Septembrie 2010, Stockholm, Suedia

Member of professional associations:

1. Romanian Society of Nanomedicine,(2008-) cofounder
2. European Society for Nanomedicine (2010-)