

TEZĂ DE DOCTORAT

Implicațiile stresului oxidativ în relație cu nanomaterialele.

Doctorand: **Teodora, Mocan**

Conducător de doctorat: **Adriana, Mureșan**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	12
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	14
1. Nanotehnologii și Nanomedicina- direcții actuale.	16
2. Stresul oxidativ -entitate fiziopatologică complexă	18
3. Implicațiile stresului oxidativ in relație cu diverse tipuri de nanoparticule	21
3.1. Nanotuburi de carbon (CNT)	21
3.1.1. Dovezi <i>in vitro</i> ale toxicității CNT.	22
3.1.2. Dovezi <i>in vivo</i> ale toxicității CNT.	24
3. 2. Nanoparticule de aur (AuNP)	28
3. 3. Nanoparticule de argint(AgNP)	29
3. 4. Nanoparticule de fier(FeNP)	30
3. 5. Nanoparticule de oxizi de metal	30
3. 6. Quantum dots(QD)	31
3. 7. Nanoparticule de praf mineral și de cuarț	32
3. 8. Nanoparticule pe bază de polimeri (nanocompozite și dendrimeri)	32
3. 9. Nanozomi	33
3. 10. Minimizarea riscurilor și măsuri de siguranță	34
4. Concluzii si tendinte viitoare.	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	36
1. Ipoteza de lucru/obiective	37
2. Studiul 1. Evaluarea <i>in vitro</i> a efectelor administrării nanomaterialului.	38
3.1. Introducere	38
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	38
3.3. Material și metodă	38
3.4. Rezultate	41
3.5. Discuții	46
3.6. Concluzii	47
3. Studiul 2. Evaluarea <i>in vivo</i> a concentrației soluției ca factor modulator al efectelor nanomaterialului la nivel plasmatic.	48
3.1. Introducere	48

3.2. Ipoteza de lucru/obiective	48
3.3. Material și metodă	48
3.4. Rezultate	50
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	57
4. Studiul 3. Evaluarea <i>in vivo</i> a tipului de administrare ca factor modulator al efectelor nanomaterialului la nivel plasmatic.	58
4.1. Introducere	58
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	58
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate	59
4.5. Discuții	66
4.6. Concluzii .	67
5. Studiu 4. Evaluarea <i>in vivo</i> a impactului exercitat de calea de administrare asupra efectelor administrării CNT asupra stresului oxidativ și inflamației.	68
5.1. Introducere	68
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	68
5.3. Material și metodă	68
5.4. Rezultate	69
5.5. Discuții	75
5.6. Concluzii .	76
6. Studiu 5. Evaluarea tranzitului hepatic și renal și a consecințelor acestora asupra	77
6.1. Introducere	77
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	77
6.3. Material și metodă	77
6.4. Rezultate	79
6.5. Discuții	100
6.6. Concluzii .	101
6. Discuții generale	102
7. Concluzii generale	103
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	104
REFERINȚE	105

REZUMAT

Cuvinte cheie: nanotuburi de carbon, stres oxidativ

Domeniul nanotehnologic, unul dintre cele mai recente domenii apărute în ultimii ani, s-a fundamentat pe observația ca materiale comune, cum ar fi aurul, argintul, fierul, siliciul, titanul sau cadmiul au capacitatea de a-și modifica proprietățile fizico-chimice și de a achiziționa proprietăți fizico-chimice unice, noi în momentul reducerii de la scara macro la dimensiuni de ordinul nanometrilor. Nanoparticulele (NP) au fost definite ca structuri sintetice, fabricate prin procedee fizice sau chimice, având un diametru <100 nm. Toate realizările de până acum (antineoplazice, imunoterapice, inginerie tisulară) impun o atenție sporită către toate fațetele interacțiunii nanoparticule-organism uman. Evaluarea toxicității NP reprezintă unul dintre orientările cele mai noi în domeniul nanomedical, justificată pe de o parte de riscul în continuă creștere al prezentei NP în mediul care ne inconjoară (sol, apa și chiar aer), și pe de altă parte de intenția administrării umane de preparate cu intenție curativă/diagnostică bazate pe NP. Evidențe preliminare sugerează implicarea diferitelor mecanisme în interacțiunea NP-organism viu, în mijlocul cărora stresul oxidativ joacă un rol aparte, necesar a fi cercetat în detaliu sub toate aspectele implicațiilor sale

Starea de dezechilibru între producția de radicali liberi și protecția antioxidantă prin creșterea agresiunii oxidative, potențial generatoare de efecte nefavorabile a fost denumită *stres oxidativ*. S-a demonstrat că radicalii liberi au capacitatea de a leza membrane, ADN, precum și proteine, aceste efecte potențial nocive făcând din stresul oxidativ o temă de intens cercetată în ultimele două decenii.

Dovezile existente în literatură sugerează că nanotuburile de carbon sunt inductoare de stres oxidativ. Mecanismele specifice stresului oxidativ se situează în centrul unor cascade fiziopatologice complexe ce includ inflamație, alterări mitocondriale, alterări ale ADN nuclear cu consecințe din cele mai diverse la nivel celular: alterări ale ciclului celular, modificări morfologice și de adezivitate, până la apoptoză.

Evidențe din ce în ce mai numeroase susțin potențialul aplicativ important al CNT pentru aplicații medicale din cele mai variate, vizând atât intenție

diagnostică cât și terapeutică. Totuși, orice administrare cu scop medical de produși pe bază de CNT presupune testare intensivă prealabilă, utilizând succesiunea standard de evaluare prin experimente *in vitro*, urmată de experimente animale. Deși există studii *in vitro* dedicate evaluării CNT, rezultatele aduse de acestea sunt încă greu de concretizat în concluzii unitare, datorită opțiunilor diferite de nanomaterial (lungime, tip CNT, tip funcționalizare, concentrații), a diferitelor tehnici de testare folosite, și nu în ultimul rând a plajei foarte extinse de linii celulare utilizate pentru testare.

Pornind de la datele deja existente în literatură, am testat *in vitro* materialul ce va face obiectului cercetărilor ulterioare, și anume nanotuburile de carbon funcționalizate cu ADN monocatenar, prin: 1) Urmărirea efectelor expunerii la nanomaterial asupra viabilității și proliferării celulare, 2) Evaluarea concentrației (1, 5, 10, respectiv 20mg/L) ca factor modulator al efectelor observate, 3) Observarea și analiza diferențelor în evoluția post-expunere induse de tipul celular, 4) Testarea prezenței și cuantificarea hiperproducției ROS intracelular ca urmare a expunerii la nanomaterial. Rezultatele obținute în cadrul acestui prim studiu demonstrează că expunerea la CNT stimulează supraproducția de ROS, modificând echilibrul redox intracelular, concentrația nanomaterialului reprezentând un factor modulator al efectelor observate. S-a demonstrat, deasemenea, că nanomaterialul prezintă, în funcție de condiții, atât valență proliferativă, cât și citotoxică în cazul expunerii celulare. O concluzie importantă a studiului este aceea că tipul celular reprezintă un factor modulator al interacțiunii celulă-nanomaterial.

Dupa evaluarea *in vitro* s-a recurs la evaluarea *in vivo*. a nanomaterialului. Într-o prima etapa s-a evaluat concentrația soluției ca factor modulator al efectelor nanomaterialului la nivel plasmatic. Astfel, studiul și-a propus: evaluarea *in vivo* a efectelor sale în administrare intraperitoneală unică asupra stresului oxidativ la nivel plasmatic precum și evaluarea *in vivo* a efectului concentrației soluției administrate asupra interacțiunii nanomaterial- organism. Rezultatele au arătat că nanomaterialul utilizat, în administrare intraperitoneală, este inductor de stress oxidativ la nivel plasmatic. Deasemenea, concentrația administrată a influențat intensitatea reacției organismului, existând o relație directă între concentrație și intensitatea efectului.

În etapa următoare s-a realizat evaluarea *in vivo* a tipului de administrare ca factor modulator al efectelor nanomaterialului la nivel plasmatic. Prin evaluarea *in vivo* a efectului exercitat de tipul administrării (unice/repetitive) asupra interacțiunii nanomaterial organism. În același studiu au fost evaluate efectele *in vivo* ale nanomaterialului în administrare intraperitoneală repetitivă asupra stresului oxidativ și inflamației la nivel plasmatic. Rezultatele obținute demonstrează că atât administrarea acută, cât și cea repetitivă, sunt promotoare de stres oxidativ și inflamație, dar cu intensitate ridicată în cazul administrării repetitive. Totuși, nu a existat o proporționalitate directă între numărul de administrări și amplitudinea sau rapiditatea efectelor observate. Datele obținute în urma testării arată potențialul de auto-intreținere pe termen lung a unor nivele ridicate de stress oxidativ după impactul inițial al administrării nanomaterialului.

Evaluarea *in vivo* a impactului exercitat de calea de administrare asupra efectelor administrării CNT asupra stresului oxidativ și inflamației a reprezentat pasul următor în testarea materialului. Astfel s-a realizat cercetarea comparativă *in vivo* a efectelor expunerii unice prin injectare intraperitoneală, respectiv subcutanată la nanotuburi de carbon asupra stresului oxidativ și inflamației la nivel plasmatic. Rezultatele obținute demonstrează că atât administrarea prin injectare intraperitoneală, cât și subcutanată, sunt promotoare de stress oxidativ și inflamație la nivel plasmatic, efectele fiind maxime la în intervalul 6-24 de ore de la administrare. Totodată, calea de administrare a determinat o dinamică diferită a efectelor în timp. Dovezile obținute arată că administrarea subcutanată este inductoare de efecte pro-inflamatorii și pro-oxidative mai marcate decât cea intraperitoneală.

Într-o ultima etapă s-a realizat evaluarea tranzitului hepatic și renal și a consecințelor acestora asupra echilibrului local inflamator, redox și funcțional după administrarea *in vivo* a nanomaterialului. S-a realizat evaluarea tranzitului hepatic, respectiv renal ca urmare a administrării *in vivo* de nanotuburi de carbon pe cale intraperitoneală, respectiv subcutanată. În cadrul aceluiași studiu s-au evaluat efectele locale hepatice/renale de stress oxidativ și inflamație ca urmare a expunerii, precum și a eventualelor consecințe funcționale ale acestora. Rezultatele noastre demonstrează că ficatul reprezintă stație certă de tranzit a nanomaterialului atât după administrare subcutanată, cât și intraperitoneală. La nivel hepatic CNT prezintă biopersistență pe termen mediu și potențial toxic pe

termen lung. Ca efect al tranzitului și biopersistenței la nivel hepatic se produc modificări semnificative ale echilibrului oxidativ și inflamator local, cu rasunet asupra echilibrului funcțional. S-a demonstrat că după administrare subcutanată sau intraperitoneală, nanomaterialul nu se cantonează la nivel renal pe termen mediu. Deasemenea, există modificări minime ale parametrilor de stres oxidativ la nivel renal, acestea putând constitui semne indirecte ale unui tranzit cu epurare rapidă (sub 3 ore) a nanomaterialului.

În concluzie, nanomaterialul utilizat este citotoxic *in vitro*. Totuși, în anumite condiții, nanomaterialul prezintă efecte proliferative, ce pot servi ca fundament pentru viitoare aplicații diagnostice/curative. Interacțiunea celulă-nanomaterial, așa cum a fost observată prin experimente *in vitro* este modulată atât de caracteristicile nanomaterialului cât și de tipul celular este inductoare de stres oxidativ, mecanism ce stă la bază efectelor sale citotoxice/proliferative. Concentrația nanomaterialului este un factor definitor al intensității reacțiilor la nanomaterial atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Administrarea nanomaterialului *in vivo* interferă cu mecanismele inflamatorii și de stres oxidativ la nivel plasmatic, având un rol preponderent pro-oxidativ și pro-inflamator. Factori precum ritmul administrării sau calea de administrare influențează în mod direct intensitatea reacțiilor la nanomaterial și dinamică în timp a reacțiilor post expunere. Administrarea intraperitoneală repetitivă de nanomaterial induce efecte mai intense decât administrarea unică, dar magnitudinea reacției nu este proporțională cu numărul administrărilor, absorbția fiind modulată de specificul de absorbție al membranei peritoneale. Depășirea capacității de absorbție prin creșterea dozei de administrare induce precipitarea nanomaterialului în peritoneu și limitarea absorbției peritoneale. Atât în cazul administrării subcutanate cât și intraperitoneale, ficatul reprezintă o stație de tranzit certă a nanomaterialului, pasajul și cantonarea la acest nivel inducând efecte pro-oxidante și pro-inflamatorii cu consecințe funcționale de tip hepatocitoliza/colestază. Consecutiv administrării intraperitoneale/subcutanate de nanomaterial nu se produce cantonarea pe termen lung a acestuia la nivel renal. Absorbția după administrare subcutanată, respectiv intraperitoneală, de nanomaterial induce reacții cu caracter predominant pro-oxidativ și pro-inflamator a căror caracter temporal și intensitate în primele 48 de ore post-expunere este diferită atât la nivel plasmatic cât și la nivel hepatic.

CV Teodora Mocan

1.Educație: .

- ▶ **1996**– Bacalaureat: Liceul “Gh.M.Murgoci” Braila;
- ▶ **2002**– Diploma Doctor-Medic Universitatea de Medicina și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca,
- ▶ **2003**- MA în Informatică Medicală și Biostatistică.
- ▶ **2005-2010** Medic Rezident Ortopedie și Traumatologie;
- ▶ **2007**– Doctorand al Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca
- ▶ **2010**– Medic Specialist Ortopedie și Traumatologie

2.Experiență profesională:

- ▶ **2002-2003**- Spitalul Clinic de Urgență, Cluj- Napoca- Medic Stagiari;
- ▶ **2005-2011**- Spitalul Clinic de Adulți “O. Fodor” Cluj-Napoca (present: *Institutul Regional de Gastroenterologie si Hepatologie Cluj-Napoca*) – Medic Rezident;
- ▶ **2007- prezent**- Universitatea de Medicina și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Disciplina Fiziologie- doctorand;
- ▶ **2008- prezent**- Universitatea de Medicina și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Disciplina Fiziologie- Asistent Universitar.

3.Project-based scientific and managerial experience in connection to PhD thesis:

- ▶ **Membru în echipă** NANOCITOX 42-112/2008:” *Evaluarea si modularea biodistributiei si citotoxicitatii nanotuburilor de carbon cu aplicatii biomoleculare*
- ▶ **Reprezentant Științific** NANOHEP 42-115/2008: “*Nanoterapia fototermică selectivă a hepatocarcinomului prin internalizare intracelulară și mecanism de activare Laser a nanotuburilor de carbon bio-ligand funcționalizate*”
- ▶ **Membru în echipă** NANOPAN 41-009/2007:”*Terapia țintită molecular a neoplasmului pancreatic prin excitarea optică rezonanță LASER a nanotuburilor de carbon funcționalizate chimic și internalizate celular.*”
- ▶ **Membru în echipă** TE 259/2010- “*Studiul interacțiunilor nanoobiectelor cu mediile celulare tumorale și posibilele lor aplicații în terapia cancerului.*”

4. Listă de publicații și patente:

Un număr de **27 articole originale** publicate în ISI Web of Science- (**factor impact de la 0 până la 5.98**).

Număr total de articole: 47. Cele mai reprezentative publicații ISI sunt listate mai jos:

1. **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 Physiologica Hungarica*, 2010, 27(3), 247-255.
2. **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, 6(3), 1207-1214
3. Clichici S, **Mocan T**, Filip A, Biris A, Simon S, Daicoviciu D, Decea N, Parvu A, Moldovan R, Muresan A. Blood oxidative stress generation after intraperitoneal administration of functionalized single-walled carbon nanotubes in rats. *Acta Physiol Hung*. 2011; 98(2):231-41.
4. Mocan T, Iancu C. Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6:1–10
5. Iancu C, Mocan L, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, Stiuftuc R, Stir A, Matea C, Iancu D, Agoșton-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. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 Jan 17;6:129-41.
6. Mocan L, Tabaran F, **Mocan T**, Bele C, Orza A, Lucan C, Stiuftuc 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. *International Journal of Nanomedicine* 2011, 6, 915-928.
7. Mahmood M, Karmakar A, Fejleh A, **Mocan T**, Iancu C, Mocan L, Iancu DT, Xu Y, Dervishi E, Li Z, Biris AR, Agarwal R, Ali N, Galanzha EI, Biris 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

8. Mahmood M., Casciano D.A., **Mocan T.**, Iancu C., Xu Y, Mocan L, Todea-Iancu D., Dervishi E., Li Z., Biris AR, Abdalmuhsen M., Ali N., Biris 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.
9. Iancu C, Ilie IR., Georgescu C, Ilie R, Biris AR, **Mocan T**, Mocan L, Zaharie F, Todea-Iancu D., Susman S, Rus Ciuca D., Biris AS. "Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the Onset of Nanomedicine". *Particulate Science and Technology*, 2009, 27(6) , 562 – 574.
10. Simon S., Biris AR, Lupu DM, Misan I, Clichici S, **Mocan T**, Biris AS, Dispersion of carbon nanotubes by single –strand wrapping for advanced biomedical applications, *Journal of Physics: Conference Series*, (2009),182, 12079.
11. Filip AG, Clichici S, Daicoviciu D, Ion RM, Tatomir C, Rogoian L, Opris I, **Mocan T**, Olteanu D, Muresan A. Possible in vivo mechanisms involved in photodynamic therapy using tetrapyrrolic macrocycles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011 Jan;44(1):53-61.
12. Filip A, Daicoviciu D, Clichici S, **Mocan T**, Muresan A, Postescu ID. Photoprotective Effects of 2 Natural Products on Ultraviolet B-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SKH-1 Mouse Skin. *Journal of Medicinal Food*. 2011 Apr 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21470043.
13. Clichici S, Filip A, Daicoviciu D, Ion RM, **Mocan T**, Tatomir C, Rogoian L, Olteanu D, Muresan A. The dynamics of reactive oxygen species in photodynamic therapy with tetra sulfophenyl-porphyrin. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010 Mar;97(1):41-51.
14. 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. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2009 Dec;18(4):455-60.
15. Mureșan A, Alb C, Suci S, Clichici S, Filip A, Login C, Decea N, **Mocan T**. Studies on antioxidant effects of the red grapes seed extract from *Vitis vinifera*, Burgund Mare, Recaș in pregnant rats. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010 Jun;97(2):240-6.
16. Seicean A, Popa D, **Mocan T**, Cristea V, Neagoie I. Th1 and Th2 profiles in patients with pancreatic cancer compared with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2009 Jul;38(5):594-5.

17. 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.

5. Cpitole de carte în edituri international: 3

1. 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.
2. 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.
3. Lucia Agoșton-Coldea, **T. Mocan**, S. Lupu. Non-invasive Imaging in approaching Ischemic Coronary Artery Disease. In Branislav Baskot, Coronary Angiography-Advances in Non-invasive Imaging for Evaluation of Coronary Artery Disease. InTech, sept. 2011, ISBN 978-953-307-675-1.

6. brevete: 1 OSIM

“Dispersarea în concentrații foarte mari a nanotuburilor de carbon cu un singur perete în apă, prin înfășurare cu AND monocatenar”-Simon Stefania, Biris Alexandru Radu, Lupu Dan Miron, Misan Ioan, Clichici Simona Valeria, **Mocan Teodora**. [NR: 125818 A2/2010]

7. Indice Hirsch și numărul total de citări, conform ISI Web of Science:

Hirsh Index: **3** Număr de citări:**25** (fără auto-citări); **34** (număr total de citări)

PhD THESIS

Implication of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles.

PhD student: **Teodora, Mocan**

Coordinator: **Adriana, Mureşan**



CUPRINS

INTRODUCTION	12
BACKGROUND	14
1. Nanotechnology and Nanomedicine- present directions.	16
2. Oxidative stress – complex physiological entity	18
3. Implication of oxidative stress in toxicity of various types of nanoparticles	21
3.1. Carbon nanotubes (CNT)	21
3.1.1. <i>In vitro</i> toxicity of CNT.	22
3.1.2. <i>In vitro</i> toxicity of CNT.	24
3. 2. Gold Nanoparticles (AuNP)	28
3. 3. Silver Nanoparticles(AgNP)	29
3. 4. Iron Nanoparticles(FeNP)	30
3. 5. Metal Oxide Nanoparticles	30
3. 6. Quantum dots(QD)	31
3. 7. Quantz and Mineral Dust Nanoparticles	32
3. 8. Polimer-based Nanoparticles (nanocomposites and dendrimers)	32
3. 9. Nanosomes	33
3. 10. Safety Measurements and Risk Assessment	34
4. Conclusions and future directions.	35
PERSONAL CONTRIBUTIONS	36
1. Hypothesis/objectives	37
2. Study 1. Evalutaion of the <i>in vitro</i> effects following nanomaterial administration.	38
2.1. Introduction	38
2.2. Hypothesis/objectives	38
2.3. Method and Material	38
2.4. Results	41
2.5. Disscussions	46
2.6. Conclusions	47
3. Study 2. <i>In vivo</i> evaluation of concentration as modulatory factor for plasma effects of nanomaterial	48
3.1. Introduction	48

3.2. Hypothesis/objectives	48
3.3. Method and Material	48
3.4. Results	50
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	57
4. Study 3. <i>In vivo</i> evaluation of administration type as modulatory factor for plasma effects of nanomaterial.	58
4.1. Introduction	58
4.2. Hypothesis/objectives	58
4.3. Method and Material	58
4.4. Results	59
4.5. Discussions	66
4.6. Conclusions	67
5. Study 4. <i>In vivo</i> evaluation of administration pathway as modulatory factor for plasma effects of nanomaterial.	68
5.1. Introduction	68
5.2. Hypothesis/objectives	68
5.3. Method and Material	68
5.4. Results	69
5.5. Discussions	75
5.6. Conclusions	76
6. Study 5. Evaluation of kidney and liver transit and their consequences over local inflammatory, redox and functional equilibrium following <i>in vivo</i> administration of nanomaterial.	77
6.1. Introduction	77
6.2. Hypothesis/objectives	77
6.3. Method and Material	77
6.4. Results	79
6.5. Discussions	100
6.6. Conclusions	101
6. General discussions	102
7. General conclusions	103
8. Originality and novelty elements	104
REFERENCES	105

SUMMARY

Key words: carbon nanotubes, oxidative stress.

Nanotechnology, the most important innovation in engineering brought by late years- uses the unique physico-chemical properties demonstrated by common materials such as gold, silver, iron, silica, titanium or cadmium when reduced at an extremely small scale. Such properties are not present in their corresponding macro-scale materials. Nanoparticles (NP) have been defined as engineered structures with diameters of < 100 nm. They represent devices and/or systems synthesized through chemical and/or physical processes. In fact, NP can be identified everywhere under the form of nanorods, nanospheres or nanotubes. All achievements by now (anti-cancer, immunotherapy, tissue engineering applications) impose increased attention towards all aspects involved at the interaction between nanomaterial and human organism. Toxicity of NP has been intensely studied lately. This is justified by increasing risk of NP presence in the environment (earth, water, air) on one hand and the intention of human diagnostic and curative administration of NP based products, on the other. Preliminary data show implication of various mechanisms, among which oxidative stress pathways are considered to play a special role in the pathogenesis of NP-induced injuries for most NP types. This mechanism needs to be studied in detail under all aspects.

The disequilibrium state between free radicals and antioxidant protection by increased oxidative aggression, with potentially unfavourable effects is known as oxidative stress. It has been proven that free radicals have the ability to induce membrane, DNA as well as protein injury, potentially noxious effects that have made oxidative stress a high-interest theme for the last two decades

Literature evidences suggest that carbon nanotubes are oxidative stress inductors. Specific mechanisms place oxidative stress in the center of complex physiopathological cascades that include: inflammation, mitochondrial alterations, cell cycle alterations, morphologic and adhesivity alterations, apoptosis.

Increasing evidences support the important applicative potential of CNT for various medical applications with both diagnostic and therapy purpose. Still, any medical purpose administration of CNT-based products needs intensive testing using the standard evaluation procedure: going from *in vitro* experiments to

animal testing. Although there already are *in vitro* studies for evaluating CNT toxicity, their results are still hard to synthesize in an unitary conclusion. Different nanomaterial options (lengths, CNT type, functionalization, concentration), different testing techniques, and least but not last different cell lines used for testing make literature homogenous.

Starting from already existing data, we made an *in vitro* testing of material that will be used for further experiments, namely: carbon nanotubes functionalized with single strand DNA. We aimed to 1) Evaluate the effects over viability and proliferation following exposure to nanomaterial, 2) To evaluate concentration (1, 5, 10, respectively 20mg/L) as modulatory factor of observed effects, 3) To observe and to analyze the differences in post-exposure effects induced by cell type, 4) To test the presence and to quantify ROS hyperproduction following nanomaterial. Results obtained in this first study demonstrate that exposure to CNT stimulates ROS production, thus modifying intracellular ROS production. Concentration represents a modulatory factor for observed effects. We were also able to demonstrate that, depending on conditions, nanomaterial exerts both proliferative and cytotoxic effects following cell exposure. One very important conclusion of this first study is that cell type represents an important modulatory factor of CNT effects.

Following *in vitro* testing, we proceeded with *in vivo* evaluation of nanomaterial. In a first step, solution concentration was evaluated as modulatory factor of nanomaterial plasma effects. The study aimed to evaluate the *in vivo* effects following acute intraperitoneal administration over plasma oxidative stress as well as to assess the *in vivo* effect of solution concentration over nanomaterial-organism interaction. Results show that, following intraperitoneal administration, nanomaterial is a plasma oxidative stress inductor. Also, administered concentration influenced intensity of organism reaction, with a direct relationship between concentration and effect intensity.

In the next step, we performed *in vivo* testing of modulatory role exerted by administration type over nanomaterial plasma effects. We have evaluated the *in vivo* effects of administration type (acute/repetitive) over nanomaterial-organism interaction. The study included assessment of oxidative stress and inflammation effect over plasma effects. Results demonstrate that acute and repetitive administration are oxidative stress and inflammation promoters, with a higher intensity in repetitive administration. However, there was no

proportionality between the number of administrations and amplitude or timing of observed effects. Obtained data show long-term self-activation potential for high oxidative stress levels following initial impact of nanomaterial administration.

In vivo evaluation of administration pathway for CNT over oxidative stress and inflammation represented the next step in nanomaterial testing. We have carried out a comparative assessment of the *in vivo* plasma effects following intraperitoneal and subcutaneous administration, respectively. Results demonstrate that both intraperitoneal and subcutaneous administration are plasma oxidative stress and inflammation promoters, with maximal effects in the 6-24 hrs interval from administration. Also, each administration pathway induced a different dynamic pattern of effects. Obtained results show that subcutaneous administration pathway represents a more aggressive pro-inflammatory and pro-oxidative administration procedure as compared to intraperitoneal administration.

In a last step, we have evaluated the liver and kidney transit of nanomaterial, along with its consequences over local inflammatory, redox and functional equilibrium. Intraperitoneal and subcutaneous administration, respectively, were used. Also, assessment of local oxidative stress and inflammatory effects as a result of exposure, as well as their possible functional consequences, was performed. Our results show that liver represents a certain transit site following subcutaneous as well as intraperitoneal administration. CNT presents long time biopersistence and toxic potential in liver following both subcutaneous and intraperitoneal administration. As a result of liver transit and biopersistence, significant alterations take place in the oxidative and inflammatory equilibrium, with significant consequences over functional equilibrium. We have proven that following subcutaneous and intraperitoneal administration, selected nanomaterial does not accumulate in the kidney, possibly due to a rapid elimination (under 3 hrs) of the nanomaterial.

In conclusion, analysed nanomaterial presents *in vitro* toxicity. Still, in certain conditions, nanomaterial presents proliferative effects that can serve as fundament for future diagnostic and curative applications. Interaction between cell and nanomaterial, as it has been observed through *in vitro* experiments is modulated by nanomaterial features as well as the cell type. The nanostructure

is an oxidative stress promoter, mechanism that sustained its cytotoxic/proliferative effects. Concentration of nanomaterial is an essential factor for reactions to nanomaterial, both *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* administration of nanomaterial interferes with plasma inflammatory and oxidative stress mechanisms, having a dominant pro-oxidative and pro-inflammatory role. Factors such as: administration rhythm or administration pathway influence the intensity of reactions to nanomaterial directly as well as the dynamics of post-exposure reactions. Intraperitoneal repetitive administration induce more intense effects as compared to single injection, but magnitude of observed effects is not proportional to number of administrations, since absorption is modulated by peritoneal absorption specificity. Overcoming of absorption capacity through increasing the administration dose induce precipitation of nanomaterial in peritoneal cavity and further limitation of peritoneal absorption. Both in the case of subcutaneous and intraperitoneal administration, liver represents a certain transit site of nanomaterial. Its passage and biopersistence induce pro-oxidative and pro-inflammatory effects with functional consequences such as hepatocytolysis/cholestasis. Consequent to administration (intraperitoneal/subcutaneous) of the nanomaterial, there is no long-term biopersistence in the kidney. We could also conclude that absorption following subcutaneous and intraperitoneal administration, respectively, induces transitory effects, with different intensity and timing for plasma and liver within the first 48 hours from administration.

CV Teodora Mocan

1. Education, degrees and diplomas.

► **1996** - BSc Degree at “Gh.M.Murgoci” High-School Braila; ► **2002** - Doctor-Physician Degree University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, ► **2003** - MA in Medical Informatics and Biostatistics. ► **2005-2010** Resident Physician in Ortopaedics and Traumatology; ► **2007** – Enrolled as PhD student at University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca ► **2010** -Specialist Physician in Ortopaedics and Traumatology

2. Professional experience, former employers.

► **2002-2003**- Emmergency Hospital, Cluj—Napoca- General Medicine Doctor;

► **2005-2008**- Adult Clinical Hospital “O. Fodor” Cluj-Napoca (presently: *Institute of Gastroenterology and Hepatology Cluj-Napoca*) - Resident Doctor;

► **2007- present**- University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, Physiology Department- PhD student;

► **2008- present**-University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, Physiology Department- Assistant Professor.

3. Project-based scientific and managerial experience in connection to PhD thesis:

► **Young Researcher (Team Member)** NANOCITOX 42-112/2008:” *Evaluation and modulation of the carbon nanotubes biodistribution and citotoxicity with biomolecular applications*

► **Scientific Manager** 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)** TE 259/2010- "Study on interactions between nanoobjects and tumour cells and their possible applications in cancer therapy".

4. List of publications and patents:

A number of **27 original articles** published in ISI Web of Science-indexed journals (**impact factor ranging from: 0 up to 5.98**).

Total number of articles: 47. Most representative ISI-indexed publications are listed below:

1. **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 Physiologica Hungarica*, 2010, 27(3), 247-255.
2. **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, 6(3), 1207-1214
3. Clichici S, **Mocan T**, Filip A, Biris A, Simon S, Daicoviciu D, Decea N, Parvu A, Moldovan R, Muresan A. Blood oxidative stress generation after intraperitoneal administration of functionalized single-walled carbon nanotubes in rats. *Acta Physiol Hung*. 2011; 98(2):231-41.
4. Mocan T, Iancu C. Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6:1–10
5. Iancu C, Mocan L, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, Stiuftuc R, Stir A, Matea C, Iancu D, Agoșton-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. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 Jan 17;6:129-41.
6. Mocan L, Tabaran F, **Mocan T**, Bele C, Orza A, Lucan C, Stiuftuc 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. *International Journal of Nanomedicine* 2011, 6, 915-928.
7. Mahmood M, Karmakar A, Fejleh A, **Mocan T**, Iancu C, Mocan L, Iancu DT, Xu Y, Dervishi E, Li Z, Biris AR, Agarwal R, Ali N, Galanzha EI, Biris 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

8. Mahmood M., Casciano D.A., **Mocan T.**, Iancu C., Xu Y, Mocan L, Todea-Iancu D., Dervishi E., Li Z., Biris AR, Abdalmuhsen M., Ali N., Biris 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.
9. Iancu C, Ilie IR., Georgescu C, Ilie R, Biris AR, **Mocan T**, Mocan L, Zaharie F, Todea-Iancu D., Susman S, Rus Ciuca D., Biris AS. "Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the Onset of Nanomedicine". *Particulate Science and Technology*, 2009, 27(6) , 562 – 574.
10. Simon S., Biris AR, Lupu DM, Misan I, Clichici S, **Mocan T**, Biris AS, Dispersion of carbon nanotubes by single –strand wrapping for advanced biomedical applications, *Journal of Physics: Conference Series*, (2009),182, 12079.
11. Filip AG, Clichici S, Daicoviciu D, Ion RM, Tatomir C, Rogoian L, Opris I, **Mocan T**, Olteanu D, Muresan A. Possible in vivo mechanisms involved in photodynamic therapy using tetrapyrrolic macrocycles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011 Jan;44(1):53-61.
12. Filip A, Daicoviciu D, Clichici S, **Mocan T**, Muresan A, Postescu ID. Photoprotective Effects of 2 Natural Products on Ultraviolet B-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SKH-1 Mouse Skin. *Journal of Medicinal Food*. 2011 Apr 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21470043.
13. Clichici S, Filip A, Daicoviciu D, Ion RM, **Mocan T**, Tatomir C, Rogoian L, Olteanu D, Muresan A. The dynamics of reactive oxygen species in photodynamic therapy with tetra sulfophenyl-porphyrin. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010 Mar;97(1):41-51.
14. 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. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2009 Dec;18(4):455-60.
15. Mureșan A, Alb C, Suci S, Clichici S, Filip A, Login C, Decea N, **Mocan T**. Studies on antioxidant effects of the red grapes seed extract from *Vitis vinifera*, Burgund Mare, Recaș in pregnant rats. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010 Jun;97(2):240-6.
16. Seicean A, Popa D, **Mocan T**, Cristea V, Neagoie I. Th1 and Th2 profiles in patients with pancreatic cancer compared with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2009 Jul;38(5):594-5.

17. 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.

5. Book Chapters: 3

1. 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.
2. 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.
3. Lucia Agoșton-Coldea, **T. Mocan**, S. Lupu. Non-invasive Imaging in approaching Ischemic Coronary Artery Disease. In Branislav Baskot, Coronary Angiography-Advances in Non-invasive Imaging for Evaluation of Coronary Artery Disease. InTech, sept. 2011, ISBN 978-953-307-675-1.

6. Patents : 1 OSIM patent

"High concentration dispersion of singlewalled carbon nanotubes in wated by means of single Strand DNA wrapping"-Simon Stefania, Biris Alexandru Radu, Lupu Dan Miron, Misan Ioan, Clichici Simona Valeria, **Mocan Teodora**. [NR: 125818 A2/2010]

7. Hirsch index and the total number of citations, according to Web of Science:

Hirsh Index: **3** Number of citations:**25 (without self-citations); 34 (total number of citations)**