

Progetto “HYperthermal Planning of Echo ultRasound-guided Laser Ablation (HYPER-LAB)”

- PI: Emiliano Schena
- Title of the Project: HYPER-LAB
- Duration of the project: 3 months
- Host Institution: “City of Hope”, *City of Hope Medical Center, 1500 E. Duarte Road, Duarte, CA 91010-3000, USA* (**Prof. Yuman Fong**, Chairman, Department of Surgery) and *Beckman Research Institute at City of Hope, 1500 East Duarte Road, Duarte, CA 91010, United States* (**Prof. Jacob Berlin**, Assistant Professor, Department of Molecular Medicine)

Host Institution

Al fine di raggiungere gli obiettivi del progetto “HYperthermal Planning of Echo ultRasound-guided Laser Ablation (HYPER-LAB)” il PI (Principal Investigator) ha trascorso un periodo di circa 3 mesi, dal 7 ottobre 2014 al 27 dicembre 2014, presso City of Hope (1500 E. Duarte Road, Duarte, CA 91010-3000, USA). In particolare il PI ha collaborato con due unità di ricerca: la prima, diretta dal Prof. Yuman Fong (in appendice A è riportata una lettera ufficiale che attesta la mia collaborazione con tale unità), è il Dipartimento di Chirurgia; la seconda, diretta dal Prof. Jacob Berlin, è il Dipartimento di Medicina Molecolare (in appendice B è riportata una lettera ufficiale che attesta la mia collaborazione con tale unità). Entrambi i professori hanno tra i propri principali interessi di ricerca il trattamento di tumori utilizzando ipertermia laser indotta. Tali interessi di ricerca sono confermati dalle lista aggiornata delle pubblicazioni dei due succitati professori che può essere visualizzata ai seguenti link:

Prof Fong: <http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=36014058900>

Prof. Berlin: <http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=36605814000>

Esperimenti condotti presso il dipartimento di Chirurgia

Il lavoro presso il Dipartimento di Chirurgia può essere diviso in due fasi: nel corso della prima fase è stato studiato lo stato dell'arte delle tecniche utilizzate per il monitoraggio della temperatura dei tessuti biologici sottoposti a termoterapia laser-indotta; nel corso della seconda fase sono stati effettuati degli esperimenti su organi escissi per analizzare le prestazioni della tecnica scelta per il monitoraggio della temperatura dei tessuti.

1. FASE 1: analisi dello stato dell'arte della termometria durante trattamenti di ipertermia

Dall'analisi dello stato dell'arte si evince che il monitoraggio della temperatura dei tessuti biologici sottoposti a termoablazione può essere effettuato con una serie di trasduttori e tecniche. Tali metodi sono generalmente suddivisi in invasivi e non invasivi. Nelle misure invasive di temperatura vengono utilizzati trasduttori che necessitano il contatto con il sito di misura.

In letteratura sono presenti vari studi che utilizzano approcci invasivi per il monitoraggio della temperatura nel corso di termoablazioni. I sensori più utilizzati sono le termocoppie, i termistori, e più recentemente sono stati introdotti particolari sensori in fibra ottica [1-10]. Tali trasduttori presentano come principale vantaggio l'ottima accuratezza (da 0.1 °C a 1 °C) e le ottime caratteristiche dinamiche (tempi di risposta anche inferiori al μ s), inoltre i sensori in fibra ottica, grazie all'immunità dalle interferenze elettromagnetiche possono essere utilizzati in procedure MR-guidate e CT-guidate. Il principale svantaggio di tutte queste tecniche è la necessità di porre a contatto l'elemento sensibile del trasduttore con il sito di misura; pertanto il trasduttore deve essere inserito nell'organo sottoposto al trattamento, rendendo la misura invasiva, con tutti i rischi associati (possibile sanguinamento e aumento dell'incidenza di infezioni). Un ulteriore svantaggio è legato al fatto che tali trasduttori forniscono la misura della temperatura solo in uno specifico punto e non una mappa della temperatura raggiunta intorno all'applicatore.

Per superare entrambi gli svantaggi succitati, nell'ultimo decennio vari gruppi di ricerca hanno focalizzando i propri sforzi nell'introduzione di tecniche non invasive per il monitoraggio della temperatura degli organi sottoposti a trattamenti di ipertermia. Le due tecniche termometriche non invasive che stanno suscitando maggiore interesse tra la comunità scientifica internazionale e stanno mostrando i risultati più promettenti sono basate sull'analisi di immagini ottenute da Risonanza magnetica (MR-based thermometry) oppure da tomografia computerizzata (CT-based thermometry) [11-23]. Sebbene con tali tecniche non si riescano a effettuare misure con l'accuratezza (l'ordine di grandezze e dei gradi Celsius) e le ottime caratteristiche dinamiche delle tecniche invasive, esse consentono di ottenere una buona risoluzione spaziale (dell'ordine del millimetro), consentono di stimare la mappa di temperatura all'interno di tutto l'organo e non solo in un punto, e, soprattutto, non sono invasive.

Alla fine dell'analisi dello stato dell'arte si è scelto di condurre esperimenti misurando la temperatura con termometria basata su immagini CT. La scelta è ricaduta su tale tecnica perché è

non invasive, e rispetto alla termometria basata su immagini di risonanza magnetica, non richiede l'utilizzo di specifiche attrezzature "MR-Compatible". Inoltre, la termometria basata su immagini di risonanza magnetica richiede sequenze sviluppate ad hoc e molto costose per ottenere elevata sensibilità alla variazione di temperatura. Questo ovviamente ne scoraggia la diffusione nella pratica clinica; al contrario per effettuare prove con termometria basata su immagini CT non sono richieste particolari caratteristiche da parte dei dispositivi utilizzati per indurre l'ipertermia (ormai tutti i dispositivi commerciali sono compatibili con l'utilizzo in CT) e non sono richiesti tool aggiuntivi da implementare sulla CT.

2. FASE 2. Termometria basata su immagini TC: teoria ed esperimenti

Nella presente sezione si procede ad una sintetica descrizione del principio di funzionamento della termometria basata su immagini CT e in seguito verranno descritti gli esperimenti svolti presso City of Hope e i risultati ottenuti.

2.1. Principio di funzionamento della termometria basata su immagini TC

Innanzitutto è necessaria una comprensione basilare della fisica essenziale che sta alla base della formazione di un'immagine TC, per poi poter descrivere la termometria basata su tali immagini.

La ricostruzione tomografica si basa sul seguente principio: vengono acquisite un cospicuo numero di proiezioni radiografiche dello stesso oggetto ad angolazioni diverse, e si ricostruisce l'oggetto nella sua terza dimensione. Una proiezione radiografica rappresenta la misura integrale (cioè una somma lungo il percorso) dell'attenuazione del fascio di raggi X lungo una certa direzione. Riprendendo altre proiezioni a diversi angoli si ottengono altre misure che possono essere utilizzate per risolvere il problema inverso della ricostruzione dell'oggetto che le ha generate. Con un'acquisizione completa si può quindi ridurre l'anatomia tridimensionale del paziente in un'immagine bidimensionale. Infatti, un'immagine tomografica (2D) corrisponde alla sezione del paziente (3D). Essa è composta da pixel (PIcture ELeMents) che mostra l'attenuazione media dei raggi X all'interno del corrispondente voxel (Volume ELeMents), come mostrato in figura 1.

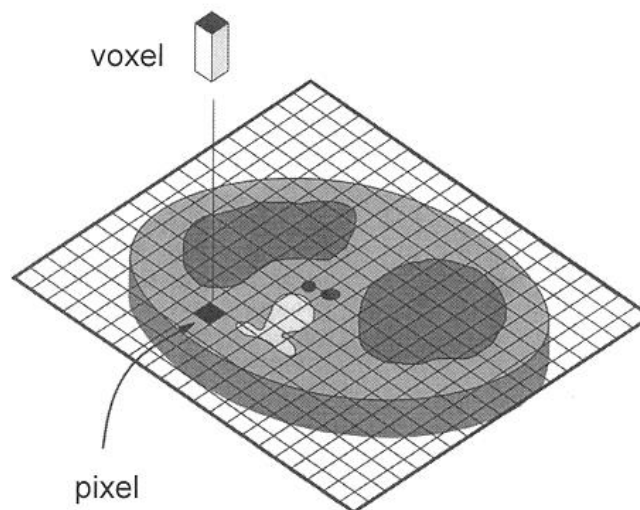


Figura 1. Il pixel è l'elemento bidimensionale di un'immagine, generalmente le immagini TC sono composte da 512x512 pixel. Il voxel ha due dimensioni uguali al pixel, mentre la terza dimensione rappresenta lo spessore della slice impostata durante la scansione.

Durante l'acquisizione una serie di RX attraversa il paziente, i raggi trasmessi vengono quindi captati dai fotodetettori a seguito di una modulazione dovuta al corpo del paziente interposto tra la sorgente dei fotoni X e i detettori. Viene misurata l'intensità dei raggi X captati.

Completata la fase di acquisizione e pre-processamento, dai dati grezzi acquisiti si procede alla generazione dell'immagine TC attraverso un algoritmo di ricostruzione, il più utilizzato è basato sulla tecnica della retroproiezione. Dopo la ricostruzione a ogni pixel è associato un valore che è indice della densità media μ valutata all'interno del voxel. Tale valore prima di essere memorizzato viene convertito in CT number, detto anche Hounsfield Unit (HU), definito dalla seguente relazione:

$$CT(x,y) = 1000 \cdot \frac{\mu(x,y) - \mu_{H_2O}}{\mu_{H_2O}} \quad (1)$$

Dove μ_{H_2O} è il coefficiente di assorbimento dell'acqua, e $\mu(x,y)$ è il coefficiente di assorbimento del tessuto presente nel corrispondente voxel.

Alla base della termometria basata su immagini TC, c'è la dipendenza dalla temperatura di parametri che possano influenzare il fenomeno fisico su cui si basa l'assorbimento degli RX: l'effetto Compton.

L'effetto Compton è un fenomeno di dispersione ottica alla cui base sta l'urto tra un fotone e un elettrone; si ha quindi che una variazione di densità molecolare, cui è linearmente legata una variazione di densità elettronica, possa influenzare tale fenomeno e quindi di conseguenza la scansione CT stessa.

Una descrizione semplificata prevede una dipendenza lineare tra il coefficiente di attenuazione μ e la densità del tessuto ρ .

La densità di un materiale varia con la temperatura per via del fenomeno della dilatazione termica. In particolare, all'aumentare della temperatura diminuisce la densità poiché il materiale si dilata, di conseguenza diminuisce il coefficiente di assorbimento del tessuto. Dall'equazione 1 si evince che lo CT number diminuisce al diminuire del coefficiente di assorbimento; in definitiva ci si aspetta una relazione inversa tra lo CT number e la temperatura. Una mappa concettuale del fenomeno è riportata in figura 2.

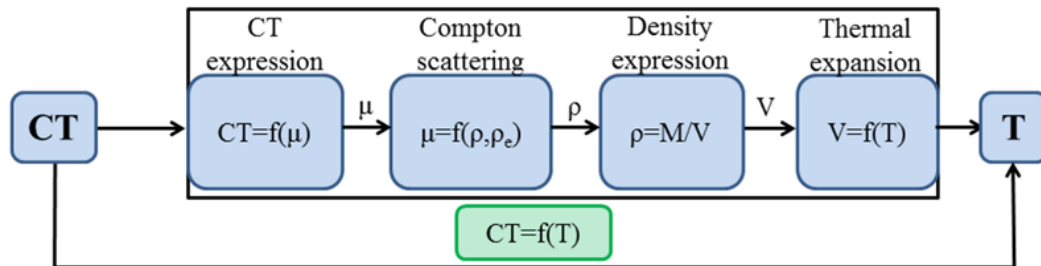


Figura 2. Descrizione schematica del principio di funzionamento alla base delle termometria basata su immagini TC.

Dalla figura 2 si evince che lo CT number, e quindi l'immagine ottenuta da TC, dipende dalla temperatura, e pertanto la variazione dello CT number può essere utilizzata come una misura indiretta della temperatura. Come mostrato sperimentalmente in vari studi [19-21], tale relazione, può essere descritta da un legame lineare, con coefficiente angolare negativo.

2.2 Termometria TC: prove sperimentali e risultati

Al fine di analizzare le prestazioni della termometria basata su immagini TC, sono state condotte prove sperimentali sottoponendo fegato escisso di bovino a trattamento di ipertermia. Durante il trattamento, durato due minuti, il fegato è stato scansionato con una TC (Discovery HD 750, GE Healthcare) per analizzare le differenze che subisce l'immagine CT al variare della temperatura. Al fine di ottenere una relazione tra le variazioni dello CT number dell'organo e le variazioni di temperatura corrispondenti, sono state inserite all'interno del tessuto due termocoppie. La misura della temperatura ottenuta dalle termocoppie è stata utilizzata come valore di riferimento per ottenere una calibrazione statica della termometria CT.

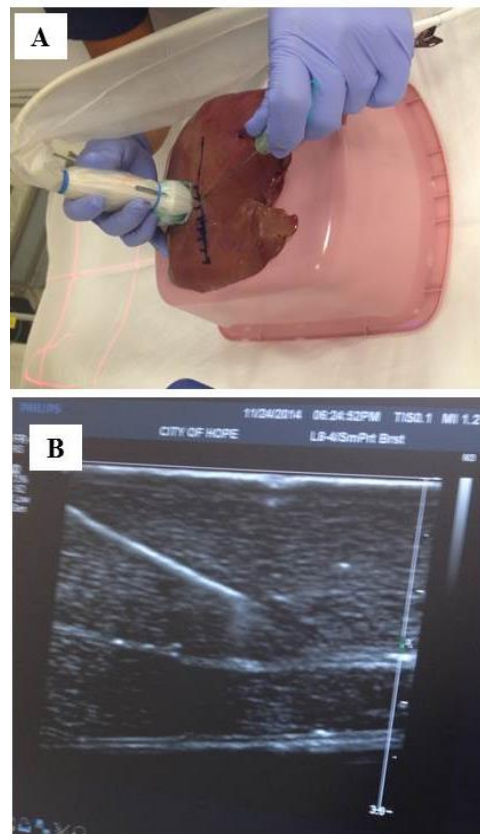


Figura 3. A) Fegato sottoposto a ecografia per visualizzare la posizione dell'applicatore; B) immagine ecografica ottenuta durante la preparazione dell'esperimento per inserire le termocoppie a una distanza nota dall'applicatore.

Al fine di inserire le termocoppie a una distanza nota dall'applicatore che induce l'ipertermia sono state utilizzate delle immagini ecografiche, come mostrato in figura 3.A e 3.B.

L'incremento di temperatura ottenuto durante tutto il trattamento (figura 4) e alla fine del trattamento (figura 5) è stato misurato a differenti distanze dall'applicatore.

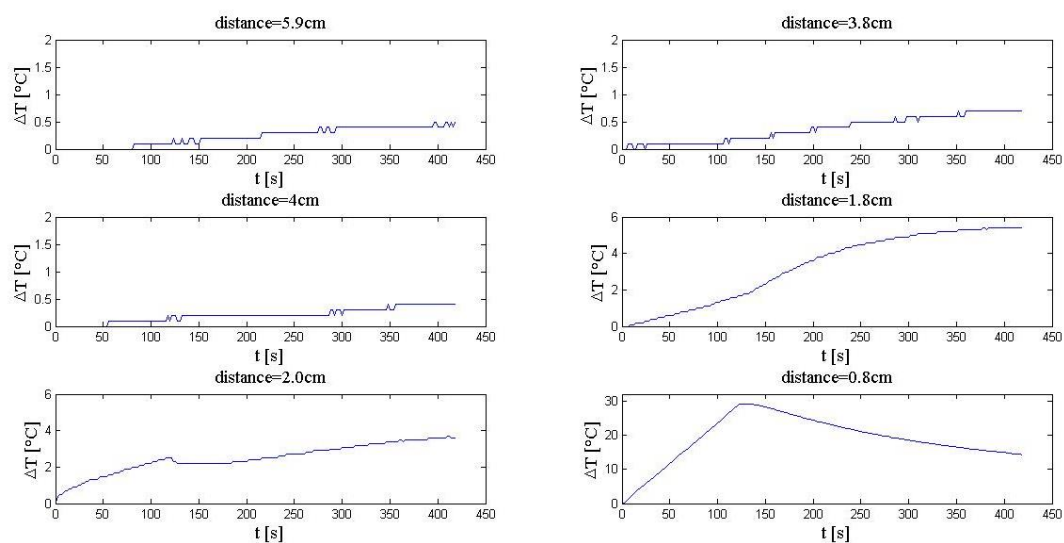


Figura 4. Andamento degli incrementi di temperatura durante il trattamento di ipertermia a differenti distanze dall'applicatore.

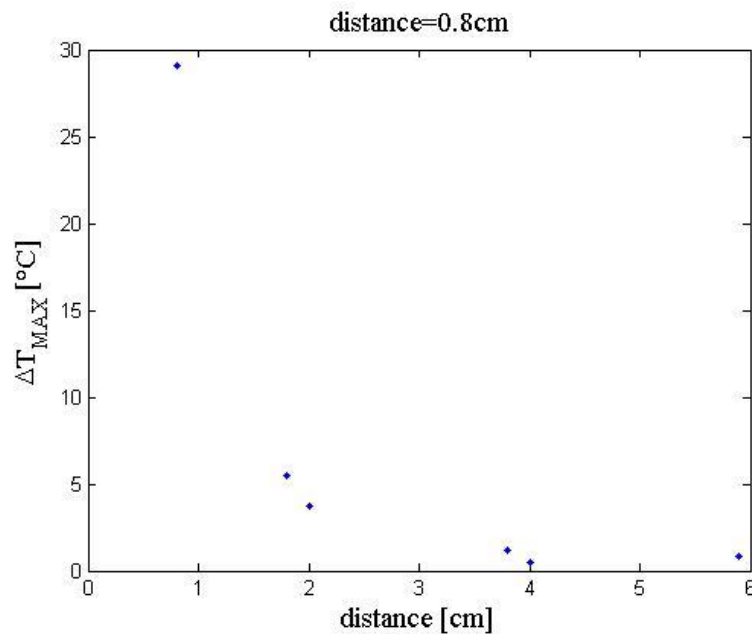


Figura 5. Incremento di temperatura massimo ottenuto alla fine del trattamento di ipertermia a differenti distanze dall'applicatore.

Si evince dalle figure 4 e 5 che l'incremento di temperatura è fortemente dipendente dalla distanza dall'applicatore e che tale andamento è ben rappresentato da un esponenziale decrescente.

In seguito sono state effettuate le scansioni dell'organo durante il trattamento. Le immagini ottenute sono state analizzate selezionando delle regioni di interesse circolari sull'immagine TC. Tali regioni di interesse sono state posizionate in corrispondenza dell'elemento sensibile della termocoppia. Dopo aver calcolato i valori medi dello CT number delle immagini, tali valori sono stati rappresentati in funzione della temperatura misurata dalle termocoppie, come mostrato in figura 6.

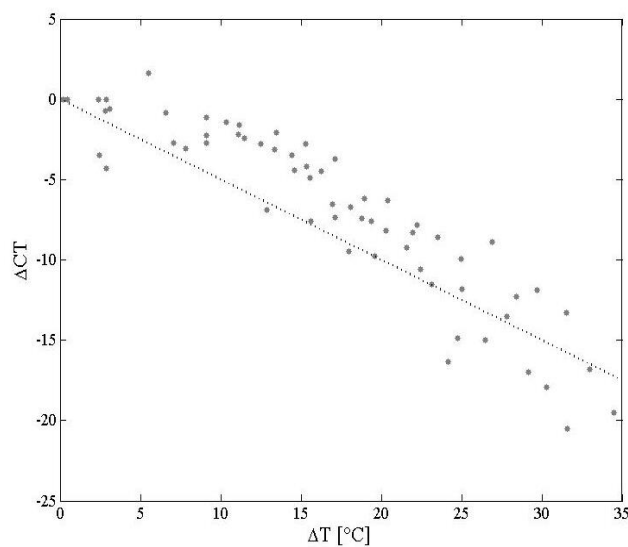


Figura 6. Curva di calibrazione della termometria CT.

Dai risultati emerge che per incrementi di temperatura fino a 35 °C circa, che sono sufficienti per indurre danno al tessuto, lo CT number ha un legame pressoché lineare con la temperatura. Dalle

caratteristiche ottenute si può ipotizzare che questa tecnica può essere utilizzata per sviluppare una piattaforma che fornisca in real time la temperatura del tessuto durante l'ablazione laser e che consenta di stimare la quantità di tessuto danneggiato. Tali informazioni possono essere utili per guidare il chirurgo nel regolare le impostazioni laser ottimali durante la procedura.

Esperimenti condotti presso il dipartimento di Biologia Molecolare

Presso il dipartimento di Biologia Molecolare sono state effettuate prove di ablazione laser su modello animale. La sperimentazione animale è stata condotta su topi, in particolare su 16 cavie, dopo l'approvazione del protocollo da parte del Comitato Etico di City of Hope (Appendice C). Il PI si è occupato della stesura del protocollo inviato al comitato etico, della revisione di tale protocollo, della procedura di ablazione laser indotta e delle misure di temperatura durante tale procedura.

L'obiettivo di tali prove è quello di valutare l'efficacia dell'introduzione di nanoparticelle di oro all'interno del tumore sul processo di ablazione. E' una tecnica recentissima, e viene considerata una delle soluzioni più promettenti per migliorare i risultati della termoterapia laser indotta. L'utilizzo di tali particelle mira ad ottenere un'ablazione laser più selettiva, consentendo di focalizzare il riscaldamento del tessuto nella massa tumorale. Infatti viene utilizzata un laser che emette ad una lunghezza d'onda scarsamente assorbita dal tessuto, mentre è fortemente assorbita dalle nanoparticelle d'oro. Questo consente di focalizzare il riscaldamento solo nella zona dove sono state introdotte tali nanoparticelle. Inoltre, poiché l'assorbimento da parte del tessuto è praticamente trascurabile, tale soluzione consente di effettuare ablazione di organi interni senza accedere con l'applicatore all'interno dell'organo [24,25], come mostrato in figura 7.

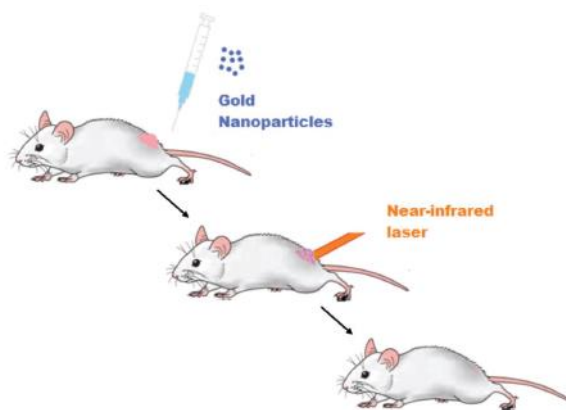


Figura 7. Rappresentazione schematica della procedura utilizzata.

Il primo step è stato quello di indurre un tumore subcutaneo alle cavie di diametro pari a circa 1 cm. Innanzitutto le cavie sono state anestetizzate (figura 8A) e in seguito sono state iniettate cellule di tumore del seno (figura 8B).

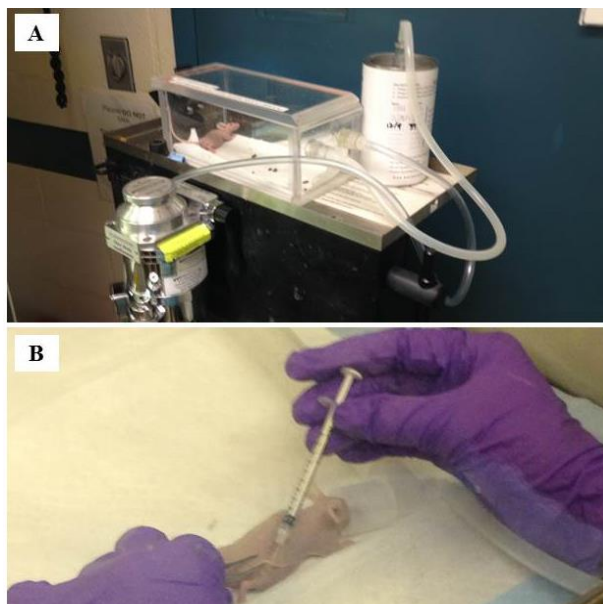


Figura 8. rappresentazione schematica della procedura utilizzata.

Dopo due giorni, all'interno di tale tumore sono state iniettate le nanoparticelle d'oro, dal diametro di 30 nm circa. Tale procedura è stata applicata a 12 cavia, le altre 4 cavia saranno utilizzate come campione di controllo. Dopo una settimana sono state effettuate le prove di termoablazione. Durante le prove di ablazione è stato utilizzato un setup sperimentale costituito da un laser a diodi che emette a una lunghezza d'onda di 810 nm e con una densità di potenza di $5\text{W}/\text{cm}^2$. Durante l'ablazione le temperature raggiunta all'interno del tumore e sulla superficie della cute della cavia in corrispondenza del tumore sono state misurate utilizzando due termocoppie di tipo K, connesse a un sistema di acquisizione a 4 canali (FX100, Yokogawa). La prima termocoppia è stata inserita all'interno della massa tumorale, la seconda sulla cute della cavia. Le misure sono state acquisite con un periodo di campionamento di 2 secondi (figura 9). Al fine di analizzare l'influenza della durata del trattamento sulla temperatura raggiunta le 16 cavia sono state divise in 4 gruppi. Il primo gruppo è stato trattato con una durata di trattamento di 5 minuti, il secondo con una durata di 2 minuti, il terzo con una durata di 1 minuto, e il quarto con una durata di 30 secondi. Ciascun gruppo era costituito da 3 cavia a cui erano state iniettate le nanoparticelle d'oro, e da una cavia che costituiva il controllo. In tal modo è stato possibile investigare l'efficacia dell'utilizzo delle nanoparticelle. Infatti ci si aspetta che la temperatura raggiunta nelle cavia con nanoparticelle sia più elevata, perché le nanoparticelle dovrebbero aumentare l'assorbimento della radiazione del laser.



Figura 9. Prove sperimentali durante l'ablazione. Le due sonde, una posizionata sulla cute e l'altra posizionata all'interno del tumore sono mostrate.

In figure 10 sono riportati gli andamenti della temperatura superficiale (in blue) e interna al tumore (in rosso) ottenuti durante gli esperimenti condotti con una durata del trattamento di due minuti. Inoltre, è riportata anche la fase di raffreddamento, che segue lo spegnimento del laser.

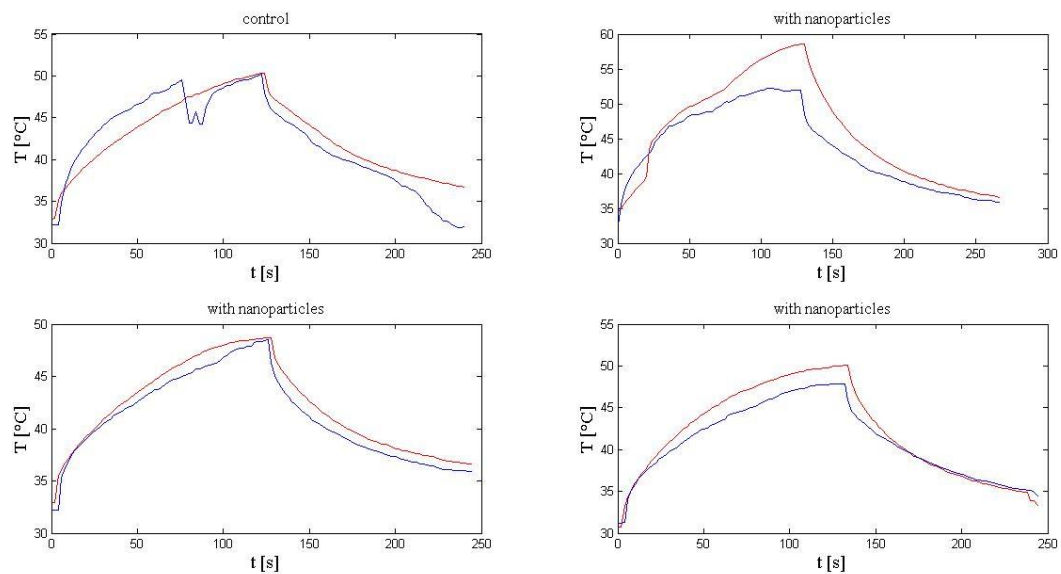


Figura 10. Andamento della temperatura durante l'ablazione di durata pari a 2 minuti. In blue è riportato l'andamento della temperatura cutanea, in rosso dell'interna.

Dalla figura 10 si evince che nel controllo la temperatura interna raggiunta è più bassa rispetto ai topi trattati con nanoparticelle. Questi risultati sono confermati anche nelle prove condotte con differenti durate del trattamento, come riportato sinteticamente in Tabella 1.

Tabella1. Temperatura riscontrata all'interno del tumore alla fine del trattamento.

Durata del trattamento	T alla fine del trattamento [°C]	
	Cavie trattate con nanoparticelle	controllo
5 minuti	55.0	44.6
2 minuti	52.5	50.3
1 minuti	49.0	41.8
30 secondi	43.2	42.0

La temperature raggiunta all'interno dei tumori trattati con nanoparticelle è risultata essere maggiore della temperature raggiunta nei tumori dei controlli. Questo risultato è conferma dell'efficacia dell'utilizzo delle nanoparticelle.

Infine, in figura 11 viene mostrato l'andamento della temperatura ottenuta alla fine del trattamento in funzione del tempo di trattamento.

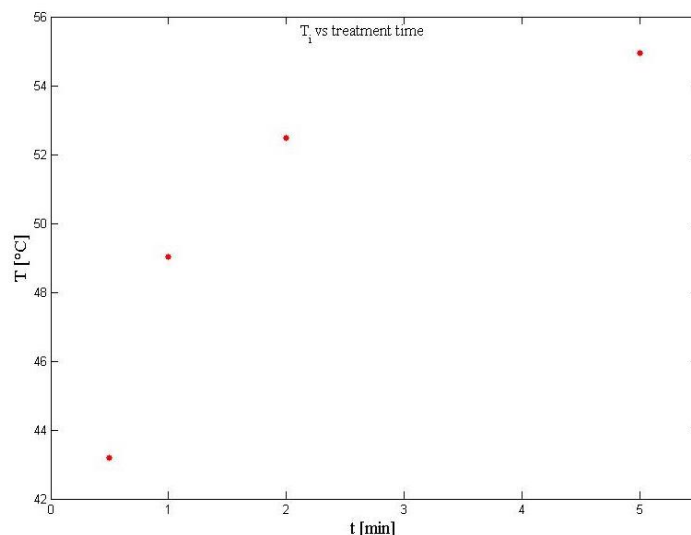


Figura 11. Temperatura raggiunta all'interno della massa tumorale alla fine del trattamento in funzione della durata dello stesso.

Dalla figura 11 si evince che, come facilmente prevedibile, la temperatura alla fine del trattamento aumenta all'aumentare della durata dello stesso. Un'informazione molto utile è legata al fatto che la temperatura raggiunta considerando una durata di 2 minuti non è molto differente da quella raggiunta con un trattamento di durata pari a 5 minuti. Pertanto nell'effettuare questo tipo di esperimenti è meglio utilizzare una durata pari a 2 minuti al fine di evitare che il fenomeno della conduzione del calore causi danno anche alle strutture adiacenti sane.

Reference

1. Tiwari U, Mishra V, Bhalla A et al. Fiber Bragg grating sensor for measurement of impact absorption capability of mouthguards. *Dental Traumatology* 2011;27(4),263-268.
2. Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN et al. Percutaneous Radio-frequency Ablation of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer: Long-term Results in 117 Patients. *Radiology* 2001;221(1),159-166.
3. Schena E, Majocchi L. Assessment of temperature measurement error and its correction during Nd: YAG laser ablation in porcine pancreas. *Int J Hyperther* 2014;30(5),328-334.
4. Rossi S, Garbagnati F, Lencioni R, Allgaier HP, Marchianò A, Fornari F. Percutaneous Radio-frequency Thermal Ablation of Nonresectable Hepatocellular Carcinoma after Occlusion of Tumour Blood Supply 1. *Radiology* 2000;217(1),119-126.
5. Saccomandi P, Schena E, Giurazza F et al. Temperature monitoring and lesion volume estimation during double-applicator laser-induced thermotherapy in ex-vivo swine pancreas: A preliminary study. *Laser Med Sci* 2014;29(2), 607-614.
6. Saccomandi P, Schena E, Caponero MA et al. Theoretical analysis and experimental evaluation of laser-induced interstitial thermotherapy in ex-vivo porcine pancreas. *IEEE T Bio-Med Eng* 2012;59(10),2958-2964.
7. Di Matteo F, Martino M, Rea R et al. US-guided application of Nd: YAG laser in porcine pancreatic tissue: an ex-vivo study and numerical simulation. *Gastrointest Endosc* 2013;78(5),750-755.
8. Van Den Bosch M, Daniel B, Rieke V, Butts-Pauly K, Kermit E, Jeffrey S. MRI-guided radiofrequency ablation of breast cancer: Preliminary clinical experience. *JMRI-J Magn Reson Im* 2008;27(1),204-208.
9. Manns F, Milne PJ, Gonzalez-Cirre X, Denham DB, Parel JM, Robinson DS. In Situ Temperature Measurement With Thermocouple Probes During Laser Interstitial Thermotherapy (LITT): Quantification and Correction of a Measurement Artifact. *Laser Surg Med* 1998;23:94-103.
10. Reid AD, Gertner MR, Sherar MD. Temperature measurement artefacts of thermocouples and fluoroptic probes during laser irradiation at 810 nm. *Phys Med Biol* 2001;46:N149-57.
11. Rieke V, Butts Pauly K. MR-thermometry. *JMRI-J Magn Reson Im* 2008;27(2):376-390.
12. Hynynen K, McDannold N, Mulkern RV, Jolesz FA. Temperature monitoring in fat with MRI. *Magn Reson Med* 2000;43(6):901-904.
13. Todd N, Diakite M, Payne A, Parker DL. In-vivo evaluation of multi-echo hybrid PRF/T1 approach for temperature monitoring during breast MR-guided focused ultrasound surgery treatments. *Magn Reson Med* 2013;72(3):793-799

14. Vimeux FC, De Zwart JA, Palussiere J et al. Real-time control of focused ultrasound heating based on rapid MR-thermometry. *Invest Radiol* 1999;34(3):190-193.
15. Seror O, Lepetit-Coiffé M, Le Bail B et al. Real time monitoring of radiofrequency ablation based on MR-thermometry and thermal dose in the pig liver in-vivo. *Eur Radiol* 2008;18(2):408-416.
16. Wansapura JP, Daniel BL, Vigen KK, Butts K. In-vivo MR-thermometry of Frozen Tissue Using R2* and Signal Intensity. *Acad Radiol* 2005;12(9):1080-1084.
17. McDannold N, Tempany CM, Fennessy FM. Uterine Leiomyomas: MR Imaging-based Thermometry and Thermal Dosimetry during Focused Ultrasound Thermal Ablation 1. *Radiology* 2006;240(1):263-272.
18. Fani F, Schena E, Saccomandi P, Silvestri S CT-based thermometry: An overview. *Int J Hyperther* 2014;30(4):219-227.
19. Schena E, Saccomandi P, Giurazza F et al. Experimental assessment of CT-based thermometry during laser ablation of porcine pancreas. *Phys Med Biol* 2013;58:1–12.
20. Pandeya G, Greuter M, de Jong K, Schmidt B, Flohr T, Outkerk M. Feasibility of noninvasive temperature assessment during radiofrequency liver ablation on computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 2011;35:356–60.
21. Weiss N, Goldberg SN, Sosna J, Azhari H. Temperature-density hysteresis in X-ray CT during HIFU thermal ablation: Heating and cooling phantom study. *Int J Hyperthermia* 2014;30:27–35.
22. Bruners P, Pandeya GD, Levit E et al. CT-based temperature monitoring during hepatic RF ablation: Feasibility in an animal model. *Int J Hyperthermia* 2012;28:55–61.
23. Weiss N, Sosna J, Goldberg SN, Azhari H. Non-invasive temperature monitoring and hyperthermic injury onset detection using X-ray CT during HIFU thermal treatment in ex-vivo fatty tissue. *Int J Hyperthermia* 2014;30:119–25.
24. Van de Broek B, et al. Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS Nano* 2011; 5: 4319-4328.
25. Kennedy LC et al. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* . 2011;7:169-183.

Appendice A



Yuman Fong, M.D.
Professor of Surgery
Chair, Department of Surgery

1500 E. Duarte Road
Duarte, CA 91010-3000
yfon@cityofhope.org
www.cityofhope.org

December 11, 2014

RE: Emiliano Schena, Ph.D.

To Whom It May Concern:

This letter serves as a confirmation that Emiliano Schena, Ph.D. has completed his sabbatical visit with the Department of Surgery at City of Hope National Medical Center in Duarte, California, USA from October 20, 2014 to December 27, 2014.

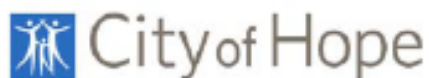
During his time here, he has performed experiments on laser ablation of biological tissue and on temperature monitoring during thermal procedures by thermocouples and CT-based thermometry. He also contributed to the academic education and exchange in the department.

We were very happy to have had this wonderful visit from Dr. Schena and look forward to working with him in the future.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Y. Fong", written over the printed name and title.

Yuman Fong, M.D.
Chair, Department of Surgery

Appendice B

Jacob M. Berlin, Ph.D.
Assistant Professor
Division of Molecular Medicine

1710 Flower Ave
Duarte, CA 91010-3000
Phone [626/256-4673]
Fax [626/930-5410]
www.cityofhope.org

December 18, 2014

Re: Emiliano Schena, Ph.D.

To Whom It May Concern,

This letter is to confirm that during his sabbatical visit at City of Hope, Dr. Schena advised my laboratory and Dr. Aboody's laboratory on performing temperature measurements during thermal ablation studies on xenograft tumors in mice. Dr. Schena was essential for the design and execution of this experiment and had the opportunity to learn new skills related to animal experiments.

It was a pleasure to get to know Dr. Schena and to work with him. I look forward to opportunities in the future to continue our collaboration.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Berlin", written over a white background.

Jacob Berlin, Ph.D.
Associate Professor
Department of Molecular Medicine
Beckman Research Institute of City of Hope

Appendice C



**CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER
BECKMAN RESEARCH INSTITUTE OF CITY OF HOPE**

**NOTICE OF INSTITUTIONAL ANIMAL CARE & USE
COMMITTEE (IACUC) ACTION**



IACUC PROTOCOL #:	13040
IACUC PROTOCOL TITLE:	MATRIX DELIVERY SYSTEMS TO IMPROVE NEURAL STEM/PROGENITOR CELL SURVIVAL WITHIN A TUMOR RESECTION MODEL

TO: Karen Aboody, M.D., Principal Investigator
City of Hope - Neurosciences

FROM: Rick Gulizia, B.Sc.
Director, Office of Laboratory Research Subjects Protection

Signature applied by Rick Gulizia on 12/16/2014 10:31:25 AM PST

DATE OF NOTICE: December 16, 2014

DATE OF REVIEW: 11/04/2014

SUBMISSION: Submission Response for IACUC Protocol Amendment

SUBMISSION REFERENCE #: 112711

DECISION: Amendment Ref # 112711 Approved with Comment

COMMENT:

Section 20.3 "Procedure Flow Table" - An administrative change was made: "The number of repeats," change all to "1," and move all original numbers under "the animal subset totals".

As the PI of this study, you are responsible for the following:

1. You are required to make sure that all research staff involved in the conduct of this animal research project have read, and have a clear understanding of the IACUC approved protocol procedures and requirements.
2. You must obtain IACUC approval prior to initiating any changes in the protocol. (No changes can be initiated until IACUC approval has been secured.)
3. You are required to report any unexpected problems involving animals as soon as you are aware of them. This report should be made to the IACUC.

If concordance review of an associated grant application is required, please contact the Director of Office of Laboratory Research Subjects Protection.