



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**“In vivo” saiakerak kolon-
ondesteko gibel metastasia
hipertermia magnetikoaren
bitartez tratatzeko**

*Irati Rodrigo, Borja Herrero,
Oihane Arriortua, Eneko Garaio,
Fernando Plazaola,
Jose Angel Garcia, Maite Insausti,
Jose Javier Echevarría-Uraga
eta Ignacio García-Alonso*

108-113 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.14>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



“In vivo” saiakerak kolon-ondesteko gibel metastasia hipertermia magnetikoaren bitartez tratatzeko

Irati Rodrigo^{1,2}, Borja Herrero³, Eneko Garaio², Oihane Arriortua^{1,4}, Fernando Plazaola², José Ángel García^{1,5}, José Javier Echevarría-Uraga⁶, Maite Insausti^{1,4} eta Ignacio García-Alonso³

¹ BCMaterials, Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures, Bizkaia Zientzia eta Teknologia Parkea, Derio, Bizkaia

² Elektrizitate eta Elektronika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

³ Kirurgia, Errodiologia eta Medikuntza Fisikoa Saila, Medikuntza eta odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁴ Fisika Inorganikoa II Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁵ Fisika Aplikatua II Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia

⁶ Galdakao-Usansolo Hospitalea, Labeaga Auzoa, Usansolo, 48960 Bizkaia
irati.rodriago@bcmaterials.net

Laburpena

Hipertermia magnetikoa minbiziaren aurkako terapia berritzaile bat da. Tumorean estrategikoki jarritako nanopartikulek kanpotik aplikatutako irati maiztasun eremu magnetiko batetik energia xurgatzen dute eta bero-iturri moduan jokatzen dute, minbizi zelulak hiltzen dituztelarik tenperatura igoeraren ondorioz. Gaur egun ikerketa ugari egiten ari dira hipertermia magnetikoa terapia alternatibo moduan aplikatzeko. Gure ikerketa taldearen helburua hipertermia magnetikoa kolon-ondesteko gibel metastasia tratatzeko eraginkorra den ikustea da. Horretarako laborategiko arratoiekin “in vivo” saiakerak egin dira Fe_3O_4 -PMAO-RGD nanopartikulak erabiliz eta 606kHz-ko maiztasuna eta $14\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ -ko intentsitatea duen eremua aplikatuz.

Hitz gakoak: Hipertermia magnetikoa, nanopartikula magnetikoak, eremu alternoa, gibel metastasia, “in vivo” saiakerak

Abstract

Magnetic hyperthermia is a cancer thermotherapy where magnetic nanoparticles placed inside or near the tumor act as heat sources activated by an externally applied magnetic field. These nanoparticles increase the temperature of the tumor cells causing the destruction of the tumor. Nowadays magnetic hyperthermia is being explored as an alternative therapy in order to treat some cancers. The aim of our work is to prove the effectiveness of the hyperthermia in “in vivo” assay in laboratory rats to treat colorectal cancer with liver metastases.

Keywords: Magnetic hyperthermia, magnetic nanoparticles, magnetic field, liver metastases, “in vivo” essay

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, nanopartikula magnetikoek (NP), garrantzi handia hartu dute medikuntzako zenbait arloetan, hala nola minbiziaren aurkako terapia berritzailea bilaka daitekeen hipertermia magnetikoan.

Garatzen ari den terapia honetan, tumorean estrategikoki jarritako nanopartikula magnetikoek eremu magnetiko aldakor baten eraginpean tumorearen tenperatura igo dezakete. Tenperatura igoera horrek minbizi zelulak hiltzen ditu (Jordan et al., 1993), (Perigo et al., 2015). Beste terapia onkologiko batzuek ez bezala, hipertermia magnetikoak minbizi ehunak hautatzeko eta erasotzeko aukera ematen du, ehun osasuntsuak kaltetu barik.

Nanopartikula magnetikoek hipertermiarako erabilgarriak izateko hainbat ezaugarri bete behar dituzte. Lehenik, dispertsatutako ingurunean egonkorrak izan behar dira, bigarrenik beroketa nahiko sortu behar dute tumorea hiltzeko; eta hirugarrenik tumorearen ehunetan homogenoki banatuta egon behar dira (Tartaj et al., 2011).

Hipertermia magnetikoan magnetitazko (Fe_3O_4) nanopartikula superparamagnetikoak erabiltzen dira nagusiki. Magnetitazko nanopartikulak ez dira giza gorputzarentzako kaltegarriak, beti ere dosia 300-600 mg NP/kg gorputz-masa baino txikiagoa bada. Dosi hori terapia honetan erabiltzen dena baino askoz handiagoa da, eta ondorioz oso aproposak dira aplikazio biomedikotarako. Gainera, beraien tamainagatik joera superparamagnetikoa dute, eta ondorioz partikula magnetikoen DC histeresi zikloa galdu egiten dute. Hori dela eta, odol sisteman barreia daitezke inolako aglomeratuak sortu barik. Hala ere, magnetitazko nanopartikula superparamagnetikoak irrati maiztasunetako eremu magnetiko baten eraginpean jartzerakoan joera histeretikoa erakusten dute, hauen magnetizazioak ezin duelako eremu magnetikoa jarraitu. Beraz, ziklo bakoitzean energia galdu egingo dute bero moduan. Bero hau izango da tumorearen tenperatura igoera sortuko duena eta ondorioz minbizi zelulen heriotza. Gainera nanopartikula mota hau, errazki moldatu daiteke tumorearen ehunetara lotu ahal izateko (Garaio et al., 2014).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Hipertermia magnetikoa terapia moduan ezartzea da arlo honetan lan egiten duten talde guztien helburu nagusia. Horretarako hainbeste saiakera egin behar dira zelula-hazkuntzetan eta animalietan. Hori dela eta, gure ikerketa taldeak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) beste ikerkuntza talde batzuk eta Galdakaoko Hospitalearekin batera hipertermiako “in vivo” saiakerak egiten ditu kolon-ondesteko gibelesko metastasia tratatzeko.

Azkeen urteetan, artikulua asko publikatu dira hipertermiaren arloan. 2007. urtean MagforceAC enpresak (Berlin, Germany) garuneko tumorea tratatzeko lehenengo saiakera klinikoak egin zituen. 2011. urtean Europar Batasunak hipertermia magnetikoa garuneko tumoreak tratatzeko baimena eman zuen eta, gaur egun, terapia hau Alemaniako 6 hospitaleetan aplikatzen da. Gainera prostatak minbizian aplikatzeko saikerak ere egiten ari dira¹.

Momentuz terapia hau soilik garuneko minbizia tratatzeko onartuta egonda ere beste minbizi mota batzuk tratatzeko ere aproposa izan daiteke. Honetariko bat kolon-ondesteko gibelesko metastasia da (Petryk, 2013). Minbizi mota honetan ohiko tratamenduak ez dira oso efektiboak, hori dela eta tratamendu alternatiboak bilatzea da minbizi mota honen erronka nagusia.

Ebakuntza da gibel metastasia sendatzeko metodarik egokiena, hala ere, bakarrik gaixoen %50ri aplikatu ahal zaio. Erauzketa perkutaneo eta kimioenbolizazio arteriala izan daitezke ebakuntzatik kanpo gelditzen diren gaixoen alternatibak (Echevarria-Uraga et al., 2012). Hala ere, metastasis masiboa duten gaixoetan kimioterapia sistemikoak, bakarrik edo kimioenbolizazio arterialarekin batera aplikatua, lortu ditu emaitza kliniko onargarriak (Gray et al., 2011).

Azkenaldi honetan, hipertermia magnetikoa terapia alternatibo moduan ikertzen ari dira gibel metastasia tratatzeko. Ikerketa honen helburu nagusia taldeak sintetizatu eta funtzionalizatu dituen magnetitazko nanopartikula gibel metastasia tratatzeko eraginkorrak diren ikustea izan da. Horretarako RGD peptidoekin funtzionalizatuta dauden magnetitazko nanopartikulak intrarterialki sartu zaizkie arratoiei gibelerara eta ikerketa taldeak sortutako gailu elektromagnetikoaren bitartez hipertermiako tratamendua aplikatu zaie laborategiko arratoiei (Garaio et al., 2015). Gero, ikerketa histopatologikoen bitartez hipertermiaren bidez hildako minbizi ehunak kuantifikatu dira tratamenduaren eraginkortasuna frogatzeko (Arriortua et al., 2016).

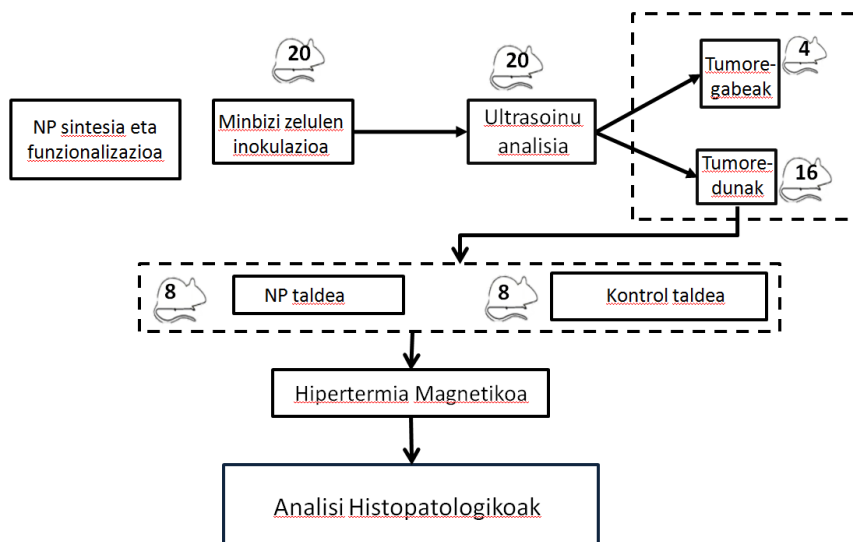
1. www.magforce.de/en/home.html

3. Ikerketaren muina

3.2 Metodologia

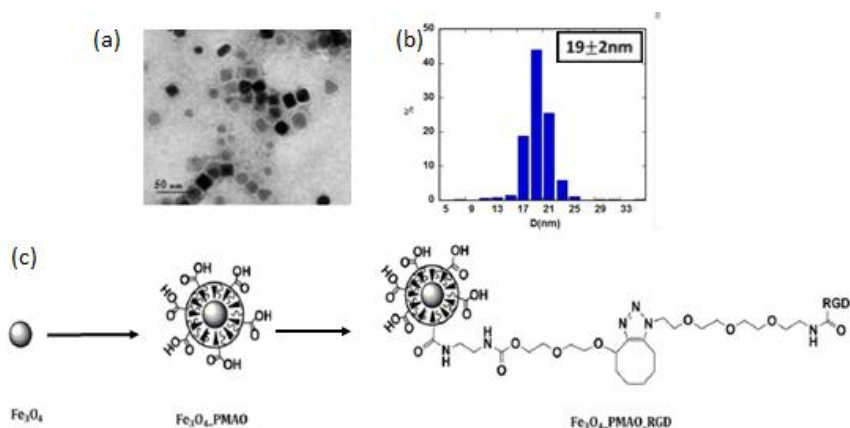
Ikerkerketa honetan kolon-ondesteko minbizi zelulak laborategiko 20 arratoiei inokulatu zaizkie gibekeko ezker lobuluan. 1.irudian ikusten den moduan 30 egun pasa eta gero, ultrasoinu analisisien bitartez ikusi da 16 arratoiek garatu dutela tumorea.

1. irudia. Ikerketan jarraitu diren urratsak



Ikerketan erabilitako magnetitazko nanopartikulak, Fe_3O_4 , deskonposizioa termikoaren bitartez sintetizatu dira. Transmisiozko mikroskopia elektronikoarekin (TME) nanopartikulen tamainuen banaketa neurtu da. 2b irudian ikusten den moduan tamainuen banaketa-kurba Gaussiar baten itxura dauka eta nanopartikulek 19 ± 2 nm-ko batzbesteko tamaina dute. Nanopartikulak inguru likidoan dispersaturik egon behar dira, izan ere, giza gorputzean horrela sartu egingo direlako. Aipatu den moduan, nanopartikulak inguru likidoan egonkor egon behar dira inolako aglomeraturik sortu gabe. Hau lortzeko magnetitazko nanopartikulak poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO) polimeroarekin inguratu dira (2c irudia). Gainera, nanopartikulak tumorearen ehunetan lotu ahal izateko RGD (arginylglycylaspartic acid) peptidoa gehitu zaie hauen gainazalera. Izan ere, peptido hauek errazki lotzen dira $\alpha_v\beta_3$ eta $\alpha_v\beta_5$ integrinetara, hauek tumoreen ehunetan gain adierazita daudelarik (Zhang et al., 2012).

2. irudia. Ikerketan erabili diren nanopartikulak (a) TME irudia (b) Tamainuen banaketa-grafikoa (c) Fe_3O_4 PMAO-RGD nanopartikulak lortzeko prozesua



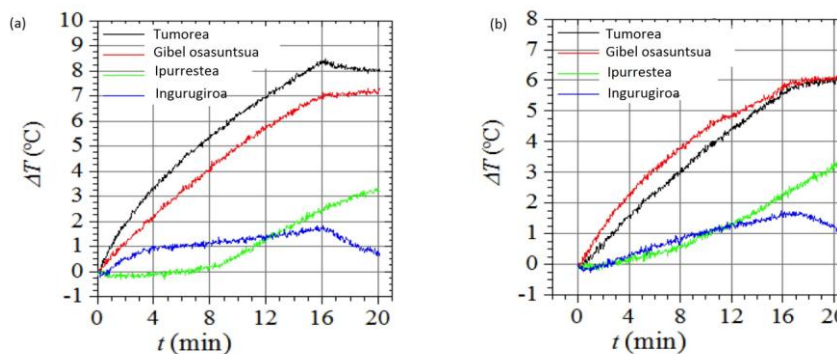
Nanopartikulak sintetizatu eta funtzionalizatu ostean, tumoredun 8 arratoiri nanopartikulak gibelera sartu zaizkie (arratoi talde honi NP taldea deitu diegu) eta beste 8ak kontrol moduan utzi ditugu gibelera gazura soilik sartuz (talde honi kontrol taldea deitu diegu). Nanopartikulak eta gazura gibela arterian kokatutako mikrokanula baten bitartez sartu dira.

24 ordu pasa eta gero 16 arratoiri hipertermia tratamendua aplikatu zaie ikerketa taldeak sortutako gailu elektromagnetikoan. 606kHz-ko maiztasuna eta $14\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ -ko intentsitatea duen eremua 21 minutuz aplikatu zaie. Temperatura igoera kontrolatzeko 3 temperatura zuntz erabili dira hipertermia aplikatzen den bitartean: Lehenengoa, tumorerik gabeko gibela zatian sartu da, bigarrena, tumorean eta hirugarrena ipurrestean. Modu honetan tumorera itsatsitako nanopartikulak temperatura igoera sortzen duten neurtu da. Bukatzeko, analisi histopatologikoak egin dira hipertermiak hiltzen duen tumorearen portzentaia kuantifikatzeko.

3.2 Emaizak

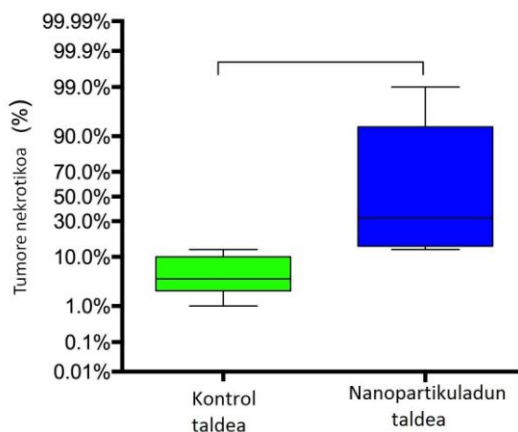
3. irudian ikusten den moduan hipertermia tratamenduaren amaieran NP taldean temperatura igoera handiagoa ikusten da tumorean gibela osasuntsuan baino. Bestalde, kontrol taldean tumorearen eta gibela osasuntsuaren temperatura tratamenduaren amaieran berdinak dira. Datuak estadistikoki tratatu dira eta ikusi da batzbeste NP taldean tumorearen temperatura $7.82\pm 1.20^\circ\text{C}$ igo dela eta kontrol taldean $4.66\pm 0.99^\circ\text{C}$.

3. irudia. Temperatura eboluzioa hipertermia tratamenduan zehar (a) NP taldea (b) Kontrol taldea



Temperatura igoera honek tumorea hiltzen duen ikusteko analisi histopatologikoak egin dira. Analisi hauetan nekrotikoa den tumorearen portzentaia kuantifikatzen da. 4. irudian ikusten denez, kontrol taldean tumore nekrotikoa % 1-13 den bitartean NP taldean % 13-99 bitartekoa da.

4. irudia. Kontrol taldean eta NP taldean tumore nekrotikoaren portzentaia



4. Ondorioak

Proiektu honetan hipertermia terapia berritzailea gibel metastasia tratatzeko eraginkorra dela frogatu da. Ikusienez, NP taldean tumorearen tenperatura kontrol taldean baino 3°C gehiago igo da. Horrek esan nahi du, alde batetik nanopartikulak tumorera itsatsi direla eta ondorioz RGD-a egokia dela lotura egiteko; eta beste aldetik, gure nanopartikulak eremuaren presentzian berotzen direla.

Tenperatura igoerak tumorea hiltzen duen frogatzeko, hau da, hipertermia eraginkorra dela ikusteko, analisi histopatologikoak egin dira. Bertan ikusi da ehun nekrotikoa %13-%99 dela NP taldean eta %1-%13 dela kontrol taldean.

Pentsa daiteke, nekrosi tarte diferentzia bi taldeen artean oso handia dela tumorearen tenperatura diferentzia 3°C-koa dela kontutan izanda. Baina aipatu behar da zelulak 43°C-tik gora hiltzen direla eta emaitzetan ikusten ez bada ere NP taldean tumoreak jasandako tenperatura igoeraren ondorioz tenperatura horretara iristen da, baina kontrol taldean ez.

Laburbilduz, gure ikerketa taldeak sintetizatu dituen Fe₃O₄-PMAO-RGD nanopartikulak gibel metastasia hipertermiaren bitartez tratatzeko eraginkorrak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gai honetan egin den lehen ikerketa izanenez, lortutako emaitzak interes handikoak direla uste dugu. Honek bide ematen digu gai honetan lan egiten jarraitzeko. Hala ere, emaitzak esanguratsuagoak izateko animali kopurua handitu behar da eta saiakera gehiago egin. Hori dela eta, taldea luzea den prozesua errepikatzen dabil emaitza gehiago lortzeko eta aurretik lortutako emaitzekin konparatzeko.

6. Erreferentziak

- Arriortua, O.K., Garaio, E., Herrero, B., Insausti, M., Lezama, L., Plazaola, F., Garcia, J.A., Aizpurua J.M., Sagartzazu, M., Irazola, M., Etxebarria, N., García-Alonso, I., Saiz-López, A. eta Echevarria-Uraga, J.J. (2016). "Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases" *Beilstein J. Nanotechnol.*, 7, 1532-1542.
- Echevarria-Uraga, J. J.; García-Alonso, I.; Plazaola, F.; Insausti, M.; Etxebarria, N.; Saiz-López, A.; Fernández-Ruanova, B. (2012). "Study of the intra-arterial distribution of Fe₃O₄ nanoparticles in a model of colorectal neoplasm induced in rat liver by MRI and spectrometry" *Int. J. Nanomed.*, 7, 2399–2410
- Jordan, A., Wust, P., Fähling, H., John W., Hinz A., eta Felix R. (1993), "Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 9, no. 1, pp. 51-68,.
- Garaio, E., Collantes, J. M., Plazaola, F., Garcia, J. A., and I. Castellanos-Rubio, (2014), "A multifrequency electromagnetic applicator with an integrated AC magnetometer for magnetic hyperthermia experiment," *Measurement Science & Technology*, 25, 115702.
- Garaio, E., Sandre, O., Collantes, J. M., García, J. A., Mornet S., eta Plazaola F. (2015) "Specific absorption rate dependence on temperature in magnetic field hyperthermia measured by dynamic hysteresis losses (AC Magnetometry)," *Nanotechnology*, vol. 26, p. 015704.
- Gray, B.; Van Hazel, G.; Hope, M.; Burton, M.; Moroz, P.; Anderson, J.; Gebiski, V. (2001). Randomised trial of SIR-Spheres plus chemotherapy vs. chemotherapy alone for treating patients with liver metastases from primary large bowel cancer. *Ann. Oncol.*, 12, 1711–1720.
- Perigo, E.A., Hemery, G., Sandre, O., Ortega, D., Garaio E., Plazaola F., Teran F.J., (2015), "Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia," *Applied Physics Reviews*, vol. 2, no. 4.
- Petryk, A. A.; Giustini, A. J.; Gottesman, R. E.; Kaufman, P. A.; Hoopes, P. (2013) "Magnetic nanoparticle hyperthermia enhancement of cisplatin chemotherapy cancer treatment." *J. Int. J. Hyperthermia*, 29, 845–851.
- Tartaj, P.; Morales, M.; Gonzalez-Carreño, T.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Serna, C. J. (2011) "The Iron Oxides Strike Back: From Biomedical Applications to Energy Storage Devices and Photoelectrochemical Water Splitting" *Adv. Mater.*, 23

Zhang, F.; Huang, X.; Zhu, L.; Guo, N.; Niu, G.; Swierczewska, M.; Lee, S.; Xu, H.; Wang, A. Y.; Mohamedali, K. H.; Rosenblum, M. G.; Lu, G.; Chen, X. (2012). "Noninvasive monitoring of orthotopic glioblastoma therapy response using RGD-conjugated iron oxide nanoparticles". *Biomaterials*, 33, 5414–5422.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahiko nizkioke lan honetan parte hartu duten ikerlari guztiei. Ikerketa hau Eneko Garaio eta Oihane Arriortuaren tesietan hasi zen eta gaur egun Borja Herrero eta bion tesian lantzen ari gara. Ikerketa hau, Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailak doktore ez diren ikertzaileak prestatzeko duen programako doktore-aurreko bekaren laguntzarekin ari da garatzen.