Опухоли в колбе

Т.С.Демина

На борьбу с онкологическими заболеваниями брошены немалые исследовательские силы. И направлены они не только на создание новых лекарств и методов лечения, но и на создание моделей, которые позволят тестировать эти лекарства. Одна из последних разработок лаборатории полимеров для биологии Института биоорганической химии РАН – новая модель твердых (со'лидных) раковых опухолей. Она не только точнее описывает поведение раковых опухолей в организме, но и позволяет сократить число экспериментов на животных.

Предположим, что есть новое лекарство от рака или вещество, которое может оказаться им. Его необходимо протестировать: посмотреть действует ли оно и какая доза нужна. Если проводить тестирование на отдельных раковых клетках, то результаты опыта могут оказаться недостоверными. Растущие поодиночке раковые клетки совсем не то, что опухоль в живой ткани.

«В жизни небольшая раковая опухоль представляет собой плотное скопление клеток. Поэтому и изучать воздействие различных лекарств надо на модели, которая как можно точнее повторяет их поведение в организме», — говорит доктор химических наук Елена Арнольдовна Марквичева, одна из создателей новой модели.

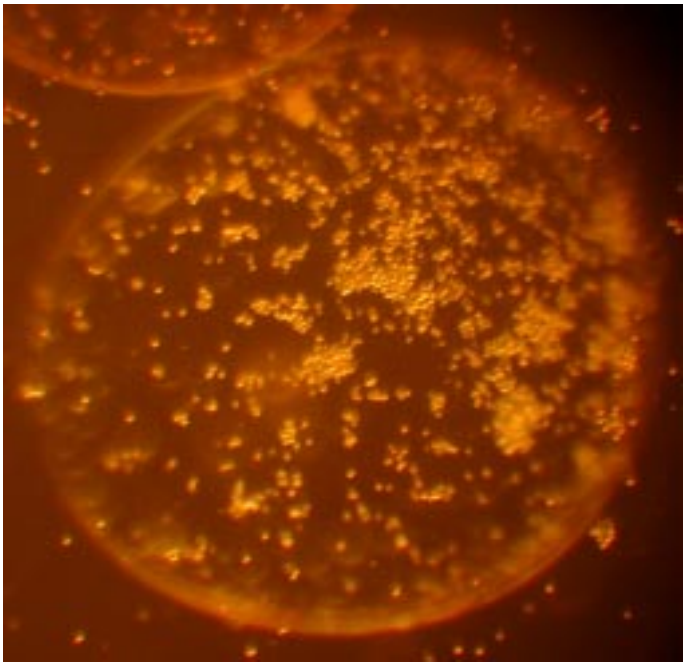
Новая модель – так называемые мультиклеточные раковые сфероиды – представляет собой микрокапсулы, в которые помещают раковые клетки. Оболочка позволяет различным веществам проникать к клеткам. А клетки, в свою очередь, могут брать из среды все, что им надо, и расти внутри капсулы. Проницаемость оболочки можно варьировать, изменяя толщину стенок. Сама капсула довольно маленькая, диаметром примерно полмиллиметра (рис. 1).

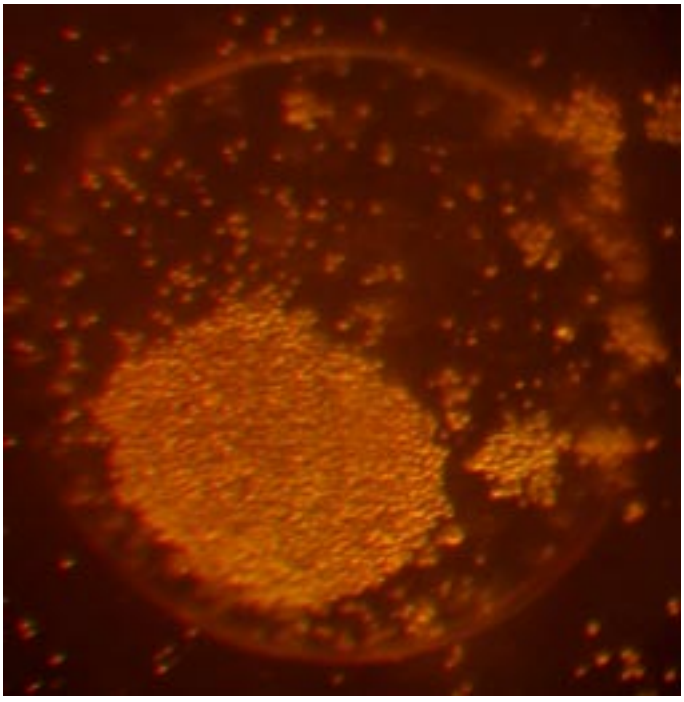
Так в чем же преимущества данной модели? Во-первых, созданные таким образом раковые сфероиды имеют заданный диаметр. Во-вторых, можно собрать в плотное скопление те раковые клетки, которые неохотно агрегируют в растворе. В-третьих, раковые клетки можно выращивать вместе с другими клетками (макрофагами, моноцитами и др.), которые присутствуют в настоящей раковой опухоли. Подобное совмещение невозможно сделать другими методами.

Есть и еще один аргумент в пользу раковых сфероидов – можно сократить число экспериментов на животных. Каждый новый препарат, как и новый метод лечения, испытывают на мышах, кроликах и т. д. Для одного эксперимента требуется не одна и не две мышки, а как минимум пятнадцать. Каждой их них прививают опухоль, она у нее вырастает, и лишь тогда на мышке начинают пробовать лекарства. И это только начальная стадия исследований.

Если заменить животных такой моделью, то это может упростить предклинические испытания. Для России это пока не настолько актуально, но в Европе опыты на животных жестко контролируют, и за мышей и кроликов берутся только тогда, когда нет других вариантов.

Как уже говорилось, на созданной таким искусственным способом раковой опухоли можно пробовать новые лекарства и методы лечения. Например, на раковых сфероидах исследуют один из перспективных методов лечения раковых опухолей – фотодинамическую терапию.



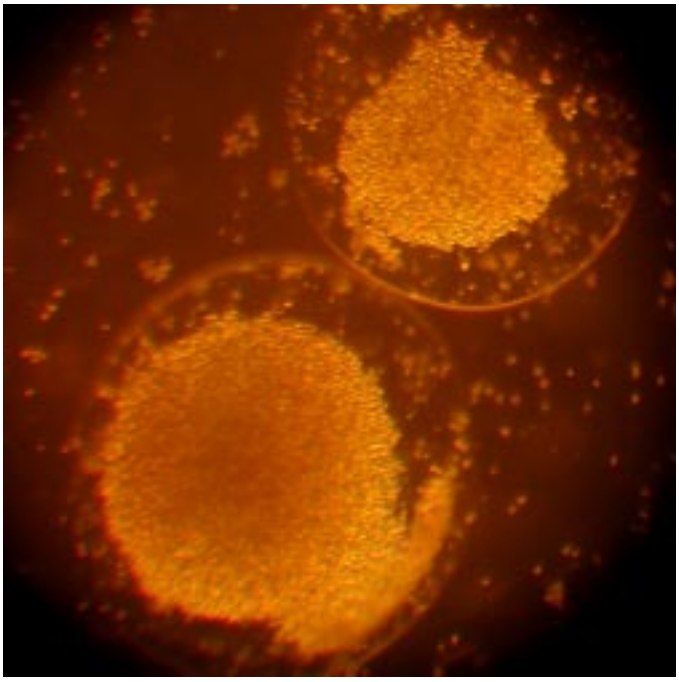


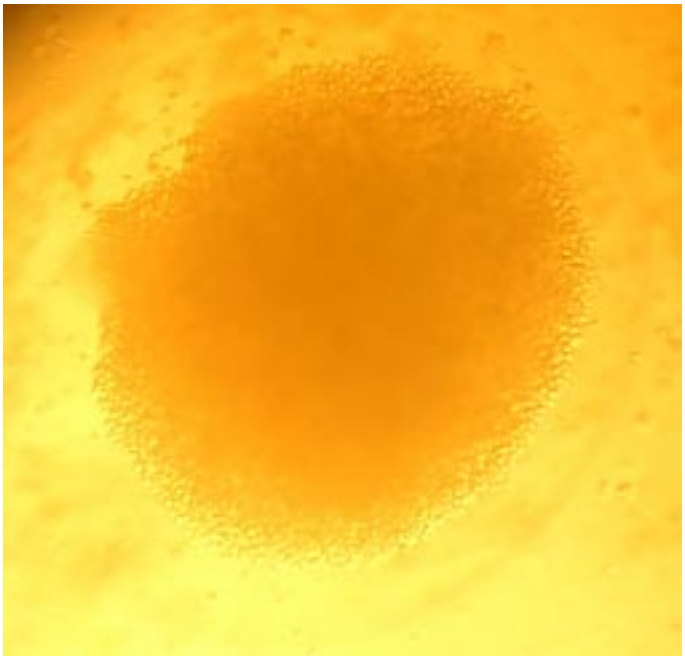
Фотодинамическая терапия основана на введении в организм светочувствительных веществ (фотосенсибилизаторов). Эти вещества избирательно накапливаются в опухоли. Затем на нее воздействуют потоком света с определенной длиной волны. Происходящая в результате фотохимическая реакция приводит к гибели раковых клеток.

Таким образом, предварительные исследования на мультиклеточных раковых сфероидах позволят минимизировать эксперименты на животных и заранее получить ответы на интересующие вопросы. Например, какую минимальную дозу надо использовать для облучения, чтобы был эффект, какое лекарство будет работать и в каком количестве. Понятно, что доза будет абсолютно не той, какая получится для отдельных раковых клеткок.

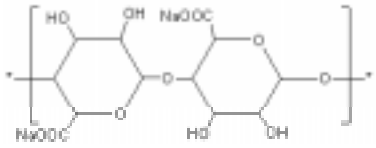
Начинка в ассортименте

В Институте биоорганической химии РАН занимаются и помещением в микрокапсулы различных лекарств. Зачем это нуж-

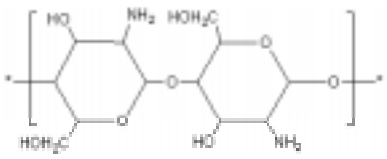




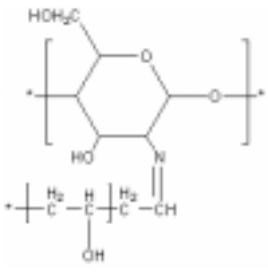
1
На этих фотографиях мы видим, как растут раковые клетки (миеломы мыши) в микрокапсуле. В первый день они свободно плавают внутри нее, но уже через две недели она становится для них тесной.



Альгинат натрия



Хитозан



Сополимер хитозана и поливинилового спирта

но? Чтобы обеспечить лекарству направленное действие либо эффективность в течение длительного времени. Микрокапсула тут нужна для того, чтобы доставить биологически активные вещества в целости и сохранности до места, где они должны действовать.

Если поместить в эти микрокапсулы не маленькие раковые опухоли, а десант против них, то он может быть доставлен только к раковым клеткам. Для этого нужно присоединить к полимерной оболочке функциональные группы, которые прореагируют с рецепторами раковых клеток. Ведь раковая клетка отличается от нормальной наличием этих самых рецепторов. Если на микрокапсуле с лекарством имеются специальные молекулы (лиганды), которые взаимодействуют именно с этими рецепторами, то лекарство будет доставлено только к раковой клетке. Таким образом, решаются сразу две задачи: защита лекарства и его направленная доставка. Точно так же лекарство можно избирательно доставлять и в другие клетки, органы и ткани, например в печень.

Вместо лекарства в микрокапсулы можно поместить своеобразные «фабрики лекарств», то есть клетки, которые производят что-то полезное, например, инсулин. Капсулы можно имплантировать в организм (под кожу), и больной диабетом человек в течение определенного времени будет получать свою дозу инсулина без инъекций.

Еще одно возможное применение - создание вакцин одноразового действия. В качестве биологически активного вещества выступает антиген. Введение его в организм вызывает защитную реакцию – вырабатываются антитела. Например, если человека укусила бешеная собака, то приходится полгода делать уколы. А вакцина на основе микрокапсул позволяет сделать всего один укол. Микрокапсулы разрушаются не сразу, а циркулируют в крови и высвобождают антиген постепенно.

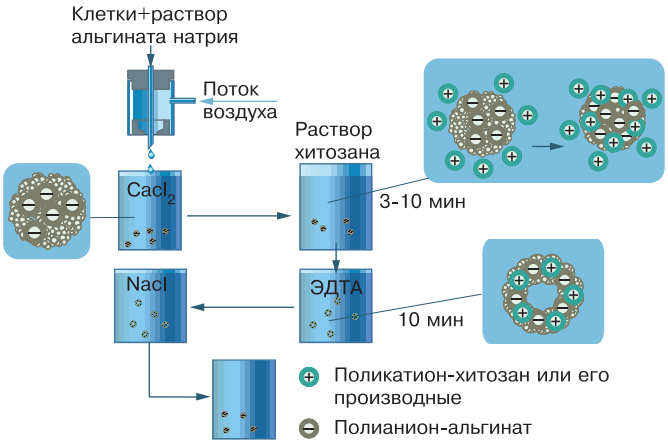
Что нам стоит дом построить

Теперь, когда мы определились с назначением микрокапсул, поговорим о том, как их делают. Но этот вопрос не прост. Например, когда мы начинаем проектировать дом, то обязательно прикидываем, какие материалы возьмем для его постройки, чтобы он получился прочным и удобным для жильцов.

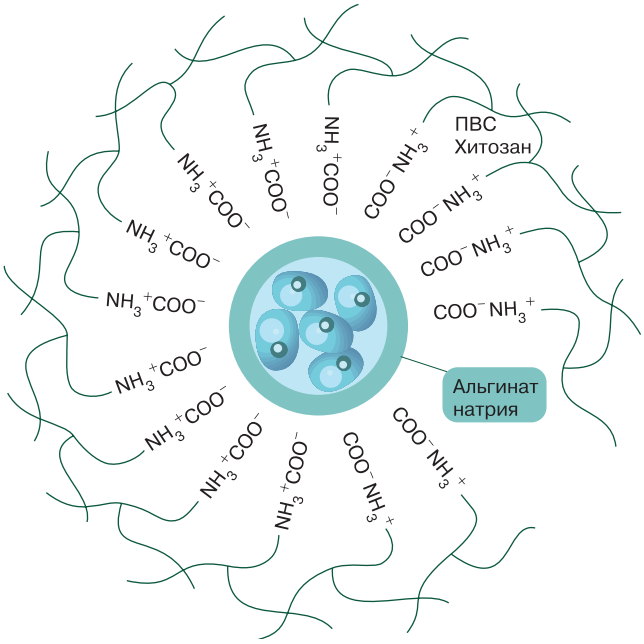
Клетки не хуже нас. Значит, материал, который мы возьмем для микрокапсул, должен, во-первых, обладать хоть какой-то прочностью, а, во-вторых, существовать в тех же условиях, что и живые клетки. К таким условиям относятся среда, она должна быть нейтральной (pH = 6—7), и температура (около 37°C). В качестве материала для микрокапсул используют природные полимеры — хитозан и альгинат.

Как известно, полимер — вещество с большой молекулярной массой, которое состоит из множества повторяющихся звеньев, соединенных между собой. Альгинат натрия – соль альгиновой кислоты, она присутствует в морской капусте и объясняет многие ее полезные свойства. А хитозан получают из хитина – вещества, которое содержится в панцирях членистоногих и стенках клеток грибов и придает им жесткость.

Однако хитозан растворяется только в кислых средах, а это никак не назовешь комфортными условиями для клеток. Чтобы повысить растворимость хитозана в нейтральных средах,



2
Схема получения микрокапсул



3
Вот как устроена оболочка микрокапсулы

ГИПОТЕЗЫ

можно уменьшить его молекулярную массу, то есть сделать его молекулы короче.

Но для инновационной модели логично использовать не менее инновационный продукт, благо фундаментальные исследования на месте не стоят. В Институте синтетических полимерных материалов РАН, а именно в лаборатории твердофазных химических реакций, разработали новый материал для медицинского применения, который хорошо растворяется в нейтральных средах, – привитой сополимер хитозана и поливинилового спирта. Привитой сополимер состоит из основной полимерной цепи (хитозан) и боковых ответвлений (поливиниловый спирт).

Этот сополимер получают в твердом агрегатном состоянии, без растворителей. Реакционную смесь, состоящую из хитина, поливинилового спирта и щелочи, помещают в экструдер. При приложении давления и сдвиговых напряжений в смеси происходят химические реакции и образуется совершенно новый полимер.

Еще одна причина, по которой именно альгинат натрия и хитозан (или его производные) используют в качестве материала для микрокапсул, – у них имеются заряженные группы. Группы альгината натрия заряжены отрицательно, то есть он полианион, а хитозан — поликатион. Почему это так важно, станет ясно чуть позже.

Внимание, фокус!

Вот теперь можно подумать, как поместить клетки в микрокапсулу. Правда, интересный вопрос? Сотрудники лаборатории предложили сделать это на стадии получения самих микрокапсул.

Сначала клетки смешивают с альгинатом натрия и с помощью специального прибора формируют из них капли заданного диаметра. От размера капли зависит и конечный размер микрокапсул (рис. 2).

Смесь раствора альгината натрия и клеток течет вниз по игле. К ней подается поток воздуха под повышенным давлением. Это нужно, чтобы капельки, образующиеся на кончике иглы, отрывались быстрее и, следовательно, имели бы меньший диаметр.

Если рассматривать этот процесс с точки зрения физики, то к капелькам, формирующимся на кончике иглы, прикладывается дополнительная сила. Без подачи воздуха есть только сила тяжести. Воздух добавляет еще одну, тянущую капли вниз.

Капли сразу попадают в раствор $CaCl_2$. Кальций замещает натрий, и вместо альгината натрия получается альгинат кальция. В чем разница? Кальций в отличие от одновалентного натрия двухвалентен - он хватает сразу два альгината, и тот превращается в нечто похожее на желе (гидрогель).

Затем полученные таким образом желеобразные микрогранулы на основе альгината кальция переносят в раствор хитозана.

Хитозан, как мы помним, поликатион, и он начинает взаимодействовать с полианионом – альгинатом. Противоположно заряженные группы начинают сближаться, образуя сеть взаимопроникающих полимеров. Чем дольше выдерживать микрогранулы на основе альгината кальция в хитозане или в его сополимере с поливиниловым спиртом, тем толще будет стенка микрокапсулы. Если поместить их туда минут на десять, толщина оболочки составит примерно пятую часть от размера всей микрокапсулы.

Потом микрогранулы перемещают в раствор натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Этот раствор с заковыристым названием убирает ставший ненужным кальций и позволяет растворить середину микрогранулы. Как это происходит? Тот альгинат кальция, который не связался с хитозаном, так как был в центре микрогранулы, реагирует с ЭДТА и переходит в растворимую форму – альгинат натрия. И он вымывается из микрогранулы.

В результате всех этих действий клетки оказываются внутри микрокапсулы на основе комплекса альгината и производных хитозана (рис. 3).

Готовые микрокапсулы с клетками попадают в питательную среду. Через полупроницаемые стенки капсулы они могут брать из среды все необходимые вещества. Эти операции должны занимать не более 40 минут, иначе многие клетки погибнут.

Подобные микрокапсулы, так же как и модели на их основе, не сказки из далекого будущего, а задачи, над которыми уже сегодня работают ученые. Институт синтетических полимерных материалов РАН создает материалы для микрокапсул, фармацевтические институты создают новые лекарства, а Институт биоорганической химии РАН помещает их в микрокапсулы. Такие вот объединенные усилия порой дают неплохие результаты. Очень хочется надеется, что они смогут в итоге увеличить число побед над раком.

Автор благодарит Дарью Зайцеву-Зотову за терпение и подробные объяснения