

НАУМЕНКО ВИКТОР АЛЕКСЕЕВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ЧАСТИЦ
НАНОРАЗМЕРНОГО ДИАПАЗОНА В МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОМ РУСЛЕ ОПУХОЛЕЙ**

1.5.4. Биохимия

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, академик РАН

Чехонин Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор, академик РАН, **Габиров Александр Габирович**
директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, **Кушлинский Николай Евгеньевич**
заведующий лабораторией клинической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор, **Макарова Ольга Васильевна**
заведующий лабораторией иммуноморфологии воспаления Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека им. А.П. Авцына» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.07 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте: <http://www.rsmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 202__ года

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности, потери трудоспособности, снижения качества жизни пациентов и сопряженных с этим экономических потерь (Burkhamer, Kriebel, and Clapp 2017; Siegel, Miller, and Jemal n.d.). Низкая эффективность традиционных методов лечения злокачественных новообразований (радикальная операция, химио- и лучевая терапия) диктует необходимость поисков новых подходов к решению проблемы. Сотни миллионов пациентов во всем мире, а также их родственники и врачи ждут появления более эффективных противоопухолевых препаратов. Основными мировыми трендами в области диагностики и лечения злокачественных новообразований являются: 1) разработка новых препаратов и способов их доставки в опухоль; 2) внедрение высокоинформативных методов диагностики онкопатологии; 3) переход к персонализированной медицине.

Использование наночастиц (НЧ) представляется перспективным во всех перечисленных направлениях (Tran et al. 2017). Во-первых, наноформуляции противоопухолевых препаратов позволяют доставлять нерастворимые в воде молекулы (KIPP 2004; Zhang et al. 2008), защищать их от биодegradации (Whitehead, Langer, and Anderson 2009), а также изменять их фармакокинетику и эффективность накопления в органе-мишени (Alexis et al. 2008; Bertrand and Legoux 2012). Также использование НЧ для селективной доставки лекарств в опухоль позволяет снизить их системную токсичность (Cortes and Saura 2010; Geisberg and Sawyer 2010; O'Brien et al. 2004). Во-вторых, некоторые типы НЧ (например, магнитные НЧ) могут использоваться для диагностики опухолевых заболеваний методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) (Wu and Huang 2017). Наконец, на пересечении диагностического и терапевтического потенциала НЧ возникает возможность их использования для предсказания эффективности лечения у каждого отдельного пациента (Miller, Arlauckas, and Weissleder 2017).

Другим многообещающим методом лечения онкопатологии является онколитическая вирусная терапия (ОВТ). В ее основе лежит использование онколитических вирусов (ОВ), способных находить, инфицировать и разрушать опухолевые клетки, не затрагивая нормальные ткани (Bell and McFadden 2014; Lichty et al. 2014). Кроме прямого литического эффекта подавление опухолевого роста осуществляется за счет активации вирусом специфического и неспецифического противоопухолевого иммунного ответа, а также развития сосудистого коллапса с последующим некрозом опухолевых тканей (Achard et al. 2018).

НЧ и ОВ находятся примерно в одном диапазоне размеров (десятки-сотни нанометров) и, как следствие, для них характерны сходные механизмы проникновения в опухоль. Несмотря на

первоначальный оптимизм, связанный с использованием НЧ/ОВ, анализ данных литературы свидетельствует о том, что только 0.7% от вводимой дозы частиц оказывается в опухоли, причем этот показатель не улучшился за последние 10 лет интенсивных исследований (Wilhelm et al. 2016). Для повышения эффективности существующих и разработки новых стратегий лечения онкологических заболеваний с помощью нанопрепаратов необходимо всестороннее исследование механизмов доставки НЧ/ОВ в опухоль (J. Shi et al. 2017).

Степень разработанности проблемы.

В настоящее время для клинического использования одобрено несколько наноформуляций противоопухолевых химиопрепаратов. Также НЧ используются в генной, иммунной, радиационной и термотерапии опухолей (J. Shi et al. 2017). Согласно недавнему отчету, самый большой класс нанопрепаратов, проходящий экспертизу для одобрения в Управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) – это липосомальные препараты, предназначенные для лечения рака (D’Mello et al. 2017). Масштабируемость синтеза, высокая биосовместимость и хорошо изученная фармакокинетика делают их привлекательной платформой для доставки лекарств. Несмотря на некоторые преимущества по сравнению с традиционными терапевтическими средствами, по-прежнему существуют ограничения в отношении адресной доставки и побочных эффектов липосомальных лекарств. Так, липосомальный доксорубин накапливается в опухолях в большей степени, чем свободный препарат, но его терапевтическая эффективность улучшается не значительно (Anchordoquy and Simberg 2017; Jain and Stylianopoulos 2010). Кроме того, степень накопления и противоопухолевая активность нанопрепаратов сильно варьируют для разных новообразований, и факторы организма/опухоли, обуславливающие такую гетерогенность, изучены недостаточно (Jain and Stylianopoulos 2010; Kano et al. 2007).

После десятилетий интенсивных исследований ОВ их эффективность была, наконец, подтверждена в клинических испытаниях. В 2015 FDA одобрило использование специально разработанного препарата на основе вируса простого герпеса Imlygic для лечения метастатической меланомы. Кроме того, реовирус дикого типа недавно получил статус орфанного препарата, а генетически ослабленный полиовирус был признан «прорывом года» в лечении отдельных видов рака. В настоящее время проходят 1, 2 или 3 фазу клинических испытаний множество других ОВ в качестве монотерапии или в сочетании с химио- и иммунопрепаратами. Несмотря на эти успехи, приходится признать, что для большинства пациентов ОБТ все еще остается не достаточно эффективной (Andtbacka et al. 2015; Galanis et al. 2012; Neo et al. 2013). Для реализации потенциала этого класса лекарств понадобится создание новых штаммов ОВ, разработка улучшенных схем

комбинированной терапии и оптимизация режима дозирования, для чего необходимо более глубокое понимание особенностей ответа опухоли на ОБТ.

На протяжении более чем 30 лет считалось, что специфическое накопление частиц нанодиапазона в опухоли обусловлено так называемым EPR-эффектом (enhanced permeability and retention) – повышенной проницаемостью кровеносных сосудов и сниженным лимфатическим дренажем (Bertrand et al. 2014; Nakamura et al. 2016). Однако в последние годы концепция EPR-эффекта вызывает резкую критику из-за серии неудач нанолекарств в клинических испытаниях (Danhier 2016; Wilhelm et al. 2016). Есть мнение, что этот пассивный механизм доставки характерен в большей мере для животных моделей, но не работает в клинике. В связи с этим все большее внимание исследователей привлекает возможность активной доставки НЧ/ОВ, в том числе с использованием клеточных носителей (Mitchell and King 2015; Tiet and Berlin 2017). Нейтрофилы (Chu et al. 2016, 2017; Luo et al. 2018; Xue et al. 2017), моноциты (Smith et al. 2013, 2014), макрофаги (Qiang et al. 2019) и стволовые клетки (Chen et al. 2019) были предложены в качестве потенциальных кандидатов для доставки нанолекарств к раковым клеткам. Исследуется также возможность использования клеточных носителей для доставки ОБ и их защиты от иммунной системы. В этой связи наибольшее внимание привлекают Т-клетки (Plett et al. 2009; Kanzaki et al. 2012; Pfirschke and Schirmacher 2009; Qiao et al. 2008) и мезенхимальные стволовые клетки (Y. Shi et al. 2010; Thorne, Negrin, and Contag 2006), а также есть сообщения об успешном использовании клеток моноцитарного происхождения в качестве векторов доставки ОБ (Martinez-Quintanilla et al. 2019).

Для разработки новых стратегий противоопухолевой терапии необходим детальный анализ процессов, происходящих в опухолевом микроокружении в ходе канцерогенеза и в ответ на лечение. Микроокружение опухоли представляет собой сложную биологическую систему, включающую как злокачественные, так и нормальные клетки, заключенные в плотный матрикс внеклеточного белка, а также хаотичную сеть кровеносных сосудов. Благодаря своим уникальным свойствам опухолевое микроокружение можно считать особым типом ткани. Особенности поведения иммунных клеток в этой ткани позволяет говорить об опухолевом микроокружении как одном из отличительных признаков рака (Hanahan and Weinberg 2011). Все большее внимание привлекают новые методы лечения, направленные на неопухолевые клетки, например, антиангиогенная терапия или иммунотерапия. Однако для повышения эффективности указанных терапевтических подходов необходимо детальное понимание взаимодействий между клетками опухолевого микроокружения и нанолекарствами.

Выяснение механизмов доставки и противоопухолевой активности НЧ/ОВ долгое время было непростой задачей из-за отсутствия адекватных методов оценки динамических взаимодействий между нанообъектами и клетками организма *in situ*. До недавнего времени арсенал доступных методов исследования опухоли ограничивался микроскопией фиксированных образцов и биохимическим анализом – методами, не позволяющими изучать поведение нанопрепаратов в организме в режиме реального времени. Ситуация существенно изменилась с появлением интравитальной микроскопии (ИВМ), предоставляющей возможность исследовать динамические процессы в интактных тканях животных на клеточном и субклеточном уровне (Naumenko, Jenne, and Mahoney 2016; Schießl and Castrop 2016). Данный метод, успешно зарекомендовавший себя в исследовании различных биологических процессов (Li et al. 2012; Ritsma et al. 2013; Stolp and Melican 2016), может быть использован для изучения механизмов доставки и противоопухолевой активности нанопрепаратов на качественно новом уровне (Miller and Weissleder 2017).

Цели исследования

Целью данного исследования являлось изучение механизмов доставки и противоопухолевой активности НЧ и ОВ с использованием метода интравитальной микроскопии.

Задачи исследования

1. Разработать методику прижизненного исследования взаимодействия НЧ и ОВ с клетками опухолевого микроокружения
2. Исследовать особенности биораспределения НЧ и ОВ методом ИВМ
3. Исследовать роль лейкоцитов в доставке НЧ и ОВ в опухоль
4. Выявить клетки-мишени для НЧ и ОВ в опухолевом микроокружении
5. Разработать алгоритмы диагностики и лечения онкопатологии с помощью нанопрепаратов на доклинических моделях опухолей

Методология и методы исследования.

Объектом настоящего исследования являются три типа НЧ (магнитные нанокубы, магнитные нанокластеры, липосомы) и онколитический вирус везикулярного стоматита (VVC). Для моделирования опухолевого микроокружения использовали более 10 линий опухолевых клеток, прививаемых мышам. Методологическую основу исследования составляет ИВМ – техника прижизненной визуализации клеточных и субклеточных процессов, происходящих в организме, в режиме реального времени. Для подтверждения основных результатов ИВМ используется широкий спектр методов визуализации (иммуногистохимия, электронная микроскопия, магнитно-

резонансная томография, биолюминесценция) и молекулярно-биологического анализа (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ и др.). Для визуализации НЧ, ОВ, опухолевых и нормальных клеток были использованы различные стратегии получения флуоресцентно-меченных микро- и нанообъектов, описанные в Главе 3. Каждый из объектов исследования изучали по общей схеме: анализ биораспределения (глава 4), механизмов доставки в опухоль (глава 5) и микрораспределения в опухолевой ткани (глава 6). Завершает экспериментальную часть исследования глава 7, в которой рассматриваются особенности доставки и противоопухолевой активности ОВ и НЧ при их повторном введении. На основании совокупности полученных результатов, в главе 7 приводится теоретическое и экспериментальное обоснование а) алгоритма персонализированной оценки эффективности липосомальных противоопухолевых препаратов; б) схемы лечения опухолей при системном введении ОВ.

Научная новизна исследования.

С использованием ИВМ был выявлен новый механизм выведения в почках наночастиц с размером, превышающим порог фильтрации гломерулярного фильтра. Впервые показано, что нейтрофил, выходящий из сосуда, может вызывать утечки липосом. Впервые показано, что соотношение пассивного и клеточного транспорта связано со временем циркуляции НЧ. Были выявлены ранее не описанные неопухолевые клетки-мишени для ОВ: В-лимфоциты и пероциты. Впервые показано, что противоопухолевая активность первой и повторной дозы ОВ опосредованы принципиально разными механизмами, в то время как микрораспределение первой дозы липосом в опухоли полностью соответствует таковому при их повторном введении.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Настоящее исследование разрешает описанную в литературе проблему парадоксальной почечной фильтрации крупных наночастиц. Изучение путей доставки НЧ в опухоль позволило ввести классификацию механизмов экстравазации (выхода из сосуда) по степени их выраженности (микро- и макроутечки) и участию нейтрофилов (спонтанные и нейтрофил-зависимые), а также выявить факторы, определяющие преимущественный механизм экстравазации. Специфическое инфицирование пероцитов опухоли при системном введении ОВ, показанное в данной работе, является существенным дополнением к принятой на данный момент парадигме противоопухолевой активности ОВТ.

Практическая значимость исследования заключается в обосновании схем противоопухолевой терапии, исходя из особенностей поведения НЧ/ОВ при их повторном введении. В работе показано, что несмотря на различные механизмы противоопухолевой

активности первой и второй доз ОВ, повторное введение вируса позволяет достичь более выраженного терапевтического эффекта, чем однократная инъекция ОВ. Напротив, первая и вторая доза липосом демонстрируют идентичное поведение *in vivo*, что позволяет использовать диагностическую дозу магнитно-контрастных липосом для индивидуального прогнозирования эффективности лечения липосомальными препаратами. Кроме того, обнаружение нового механизма выведения крупных НЧ в почках открывает возможность использования нанопрепаратов для диагностики и лечения нефрологических заболеваний. Выявление нейтрофил-ассоциированного транспорта НЧ дает обоснование использования этих клеток в качестве векторов доставки препаратов в опухоль. Идентификация перицита как новой клетки-мишени в опухолевом микроокружении, общей для липосом и ОВ, открывает перспективу разработки принципиально новых схем противоопухолевой терапии. Так, увеличение чувствительности опухолевых перицитов к вирусной инфекции может быть достигнуто за счет неоадьювантной терапии липосомальными препаратами, несущими цитокины. Также это фундаментальное открытие может быть использовано для доставки с помощью НЧ/ОВ к перицитам молекул и генов, обладающих антиангиогенными свойствами.

Личный вклад

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.4. Биохимия («Медицинские науки») и области исследований п.5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства», а также паспорту 1.5.22. Клеточная биология («Медицинские науки») и области исследований п.6 «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии.»

Положения, выносимые на защиту

1. Наночастицы магнетита с размером, превышающим порог фильтрации гломерулярного фильтра, попадают в почечные канальца из перитубулярных капилляров путем трансмиграции через эндотелий и тубулярный эпителий.
2. Наночастицы магнетита попадают в опухоль путем пассивных утечек и на мигрирующих нейтрофилах, при этом вклад клеточного транспорта возрастает с уменьшением времени циркуляции НЧ.
3. Липосомы попадают в опухоль за счет микро- и макроутечек, при этом каждый из указанных путей доставки может быть как спонтанным, так и вызванным экстравазацией нейтрофилов.
4. Основными клетками-мишенями в опухолевом микроокружении для НЧ магнетита являются макрофаги, для онколитических вирусов – перициты; липосомы накапливаются как в макрофагах, так и в перицитах.
5. Механизмы доставки и характер микрораспределения первой и повторной доз липосом идентичны, что позволяет предсказывать эффективность липосомальных противоопухолевых препаратов путем предварительного анализа накопления МРТ-контрастных липосом.
6. Повторное введение ОВ с интервалом в 48ч не приводит к инфекции опухолевых клеток, но способствует распространению инфекции первой дозы и усилению противоопухолевого Т-клеточного ответа, повышая эффективность терапии.

Внедрение результатов исследования

Методика проведения интравитальной микроскопии внедрена на базе Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского" и в настоящий момент используется для решения широкого спектра медико-биологических задач. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, стали основой для разработки новых терапевтических подходов к лечению онкологических заболеваний, которые в настоящий момент проходят доклинические испытания в рамках выполнения грантов РФФИ и РФФИ.

Апробация результатов.

Результаты исследования были представлены в виде устных докладов и обсуждены на конференциях, в том числе: саммит по иммунотерапии опухолей (26-29 июня 2016 г, Галифакс, Канада), конференция «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (2-3 ноября 2017 г, Минск, Беларусь), вторая международная научно-практическая конференция «Магнитные наноматериалы в биомедицине: синтез, свойства и применение» (23-27 октября 2017 г, Звенигород, Россия), международная конференция по Наномедицине и

Нанобиотехнологии 2018 (26-28 сентября 2018 г, Рим, Италия), «4-й национальный конгресс по регенеративной медицине (20-23 ноября 2019 г, Москва, Россия). Аprobация диссертации состоялась 9 июня 2021 г.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 15 статей в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК, в том числе, 9 из них – в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 394 листах машинописного текста, состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 582 источника. Текст иллюстрирован 3 таблицами и 191 рисунком.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИНТРАВИТАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЬ НАНОЧАСТИЦ И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

1.1. Получение и описание свойств флуоресцентно-меченных нанопрепаратов и опухолевых клеток

Основу интравитальной микроскопии составляет детекция флуоресцентного сигнала от нано- и микрообъектов в тканях живого организма. Для исследования биораспределения и механизмов доставки в опухоль наночастиц и онколитических вирусов необходимы флуоресцентно-меченные: а) нанопрепараты; б) клетки опухоли; в) клетки организма.

В работе были использованы наночастицы магнетита (НЧМ), ковалентно связанные с цианиновым красителем Cy5 (Рисунок 1А-Б), и липосомы, в состав которых был включен липофильный краситель (DiD или DiO; Рисунок 1В). Стабильность комплекса наночастица-краситель оценивали в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В частности, было показано, что в физиологических условиях (100% мышьяная сыворотка, 37°C) НЧ на протяжении нескольких суток сохраняют стабильный гидродинамический размер, и при этом не происходит утечка флуорофора из НЧ. Также было установлено, что профили биораспределения НЧ в органах, измеренные по флуоресцентному сигналу и по концентрации железа, хорошо коррелируют между собой, в то время как поведение свободного красителя *in vivo* значительно отличается от картины,

наблюдаемой при введении меченных НЧ. В совокупности, эти результаты указывают на то, что наличие красителя не изменяет биологических свойств НЧ и может быть использовано для наблюдения за ними *in vivo*.

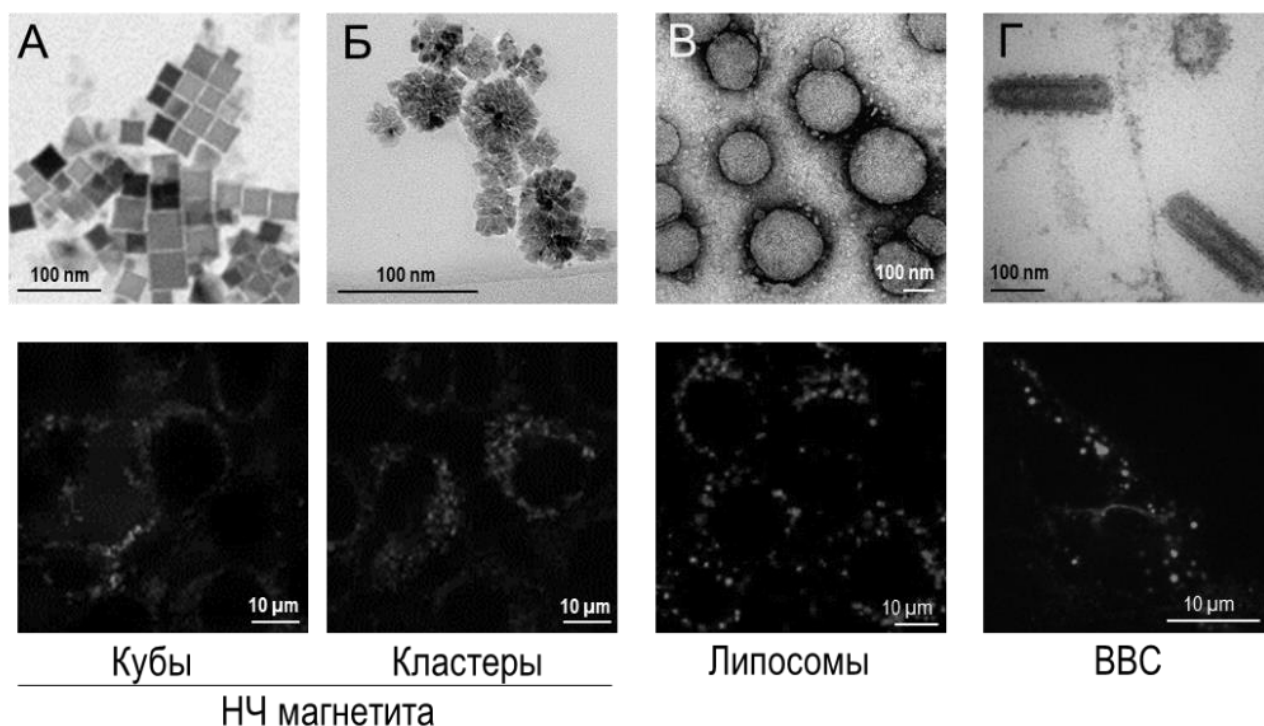


Рисунок 1. Объекты исследования. Электронно-микроскопические изображения НЧ магнетита кубической (А) и кластерной (Б) формы, липосом (В) и вируса везикулярного стоматита (Г). Нижний ряд – конфокальные изображения флуоресцентно-меченных НЧ и вирионов в клетках культуры 4Т1.

Для того чтобы получить флуоресцентно-меченный ВВС, было использовано несколько красителей: аминоксильные квантовые точки, аминоксильный цианиновый краситель Alexa Fluor 647 (AF647) и липофильный краситель FSL-(Function-Spacer-Lipid)-флуоресцеин. Все три подхода позволили обеспечить визуализацию вируса, однако использование квантовых точек и FSL-флуоресцеина значительно снижало инфекционную активность ВВС *in vitro*. Напротив, красители группы AF не влияли на инфекционный потенциал ВВС вплоть до концентрации 100 мкг/мл, позволяя получать более 98% меченных вирионов (Рисунок 1Г). Этот подход оказался также эффективным для *in vivo* визуализации других ОБ (Мараба, реовирус). Было показано, что введение мышам с опухолями СТ26 как нативного ВВС, так и конъюгированного с AF647 вируса приводит к сходному характеру инфекции в опухоли, а также в лимфоузлах и селезенке. Также не отличалась терапевтическая эффективность ВВС-AF647 и неконъюгированного с красителем

вируса. Эти данные подтверждают, что красители группы AF не нарушают биологической активности вируса.

Клетки рака молочной железы (4T1), рака прямой кишки (CT26) и меланомы (B16) мыши, а также клетки рака простаты человека (22Rv1) были трансдуцированы лентивирусами, несущими гены флуоресцентных протеинов (GFP, YFP, RFP; Рисунок 2Б-Г). Потенциальное влияние флуоресцентных белков на свойства полученных клеток оценивали *in vitro* комплексом методов: подсчетом митотического и апоптотического индексов, оценкой клеточной пролиферации методом MTS и наблюдением за скоростью роста клеток с помощью измерения электрического сопротивления монослоя. Полученные данные позволяют заключить, что *in vitro* трансдуцированные клеточные линии не отличаются по морфологии и скорости роста от клеток, не несущих флуоресцентные трансгены. Однако анализ туморогенности модифицированных клеточных линий *in vivo* показал, что опухоли CT26-GFP отторгаются за счет CD8-опосредованного Т-клеточного ответа. Остальные линии клеток, несущие гены флуоресцентных протеинов (включая CT26-RFP), не отличались по скорости роста от опухолей дикого типа и были использованы в дальнейшей работе.

Визуализацию клеток организма (Рисунок 2Б, В, Д) осуществляли путем внутривенного введения флуоресцентных антител к маркерам лейкоцитов (CD45, CD8, CD4, B220, Ly6G, Ly6C, CD11b, F4/80, CD169 и др.) и эндотелиальных клеток (CD31).

1.2. Разработка методики исследования опухолевого микроокружения методом ИВМ

Для проведения микроскопии опухолевого микроокружения были отработаны методики оперативного вмешательства, позволяющие получить стабильный препарат дорсальных и абдоминальных опухолей без нарушения их кровоснабжения (Рисунок 2А). Была подобрана панель флуорофоров, позволяющая одновременно детектировать до 8 каналов при использовании конфокальной микроскопии (Рисунок 2Б) и до 5 каналов при использовании мультифотонного лазера (Рисунок 2В). С учетом задач, связанных с исследованием нанопрепаратов, использовались режимы съемки, позволяющие сканировать обширные участки опухоли (Рисунок 2Б), изучать субклеточные структуры (Рисунок 2Д), получать 3D-изображения тканей (Рисунок 2Г), а также исследовать динамику биологических процессов с высоким временным разрешением.

Методика интравитального исследования онколитических вирусов в опухолевом микроокружении была впервые разработана на платформе микроскопа Leica SP8 MP в Университете Калгари (Канада) и внедрена в России на базе ФГБУ «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П.Сербского» на платформе микроскопа Nikon A1R.

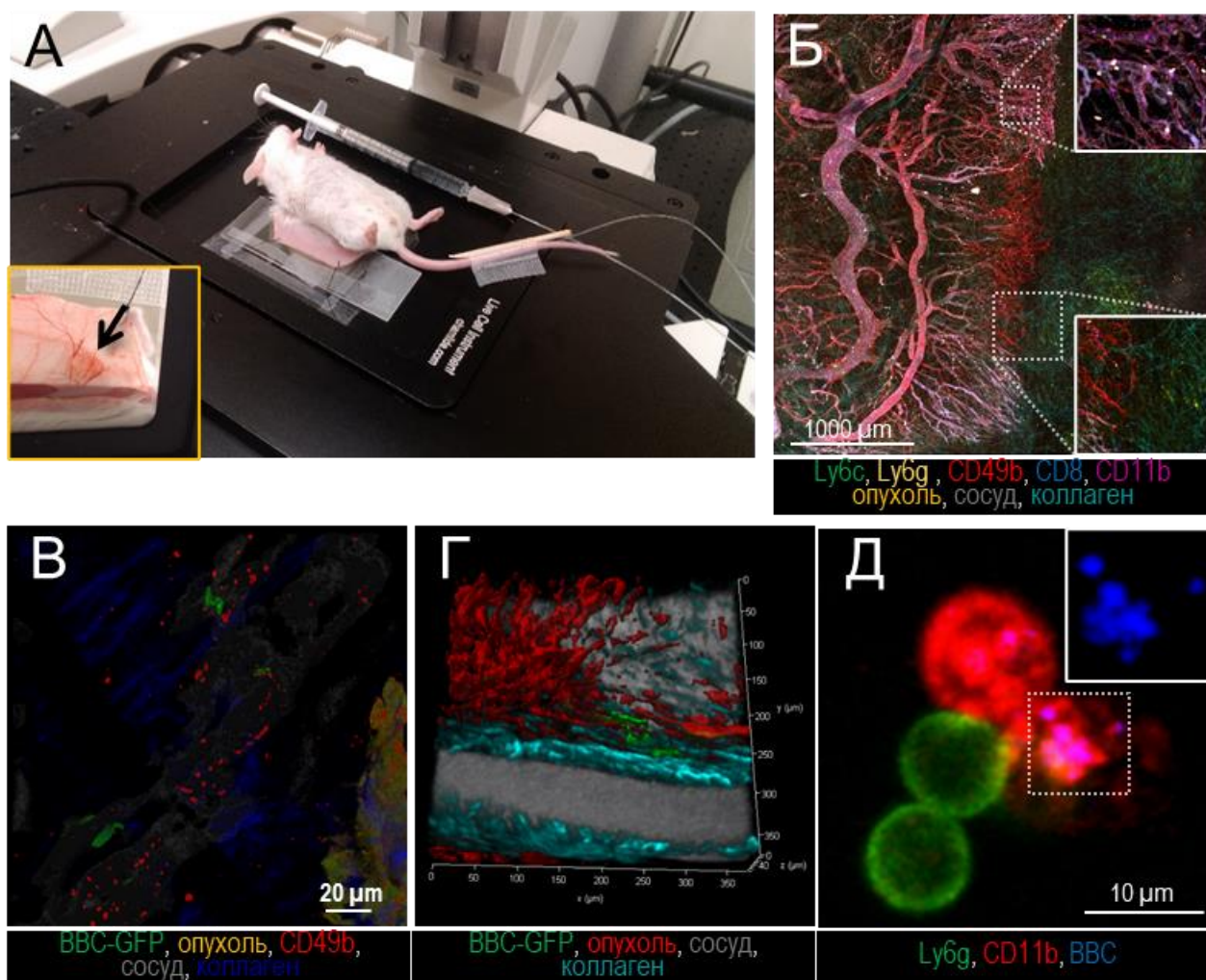


Рисунок 2. Разработка методики прижизненной визуализации опухолевого микроокружения. А. Положение животного на платформе конфокального микроскопа при проведении ИВМ; стрелка на вставке указывает на опухоль. Б. Восьми-цветная конфокальная микроскопия опухоли ST26-YFP. В. Пяти-цветная мультифотонная микроскопия опухоли ST26-YFP. Г. Объемная реконструкция участка опухоли ST26-RFP. Д. Визуализация флуоресцентно-меченных вирионов на поверхности опухолевых лейкоцитов.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

2.1. Выявление нового механизма почечной экскреции для наночастиц с размеров выше порога гломерулярного фильтра

Согласно современным представлениям, способность наночастиц выводиться из организма через почки определяется размером пор гломерулярного фильтра, который составляет 6 нм. Частицы, диаметр которых больше указанного порогового значения, не могут попадать в мочу.

Однако в последние годы в литературе накапливается все больше свидетельств парадоксальной почечной фильтрации крупных НЧ. Аналогичную картину мы наблюдали при исследовании биораспределения 140-нм НЧМ. Через 2 ч после внутривенного введения НЧМ отмечалось транзиторное повышение уровня железа в почках (Рисунок 3А), сопровождавшееся негативным контрастированием почечной паренхимы на МРТ (Рисунок 3Б). Накопление НЧМ-Су5 в почках подтвердилось при измерении флуоресценции органов *ex vivo* методом IVIS, а также при конфокальной микроскопии почек. Кроме того, введение НЧМ сопровождалось повышением содержания железа в моче (Рисунок 3В), а ультраструктурный анализ показал наличие в мочевом осадке интактных НЧ (Рисунок 3Г).

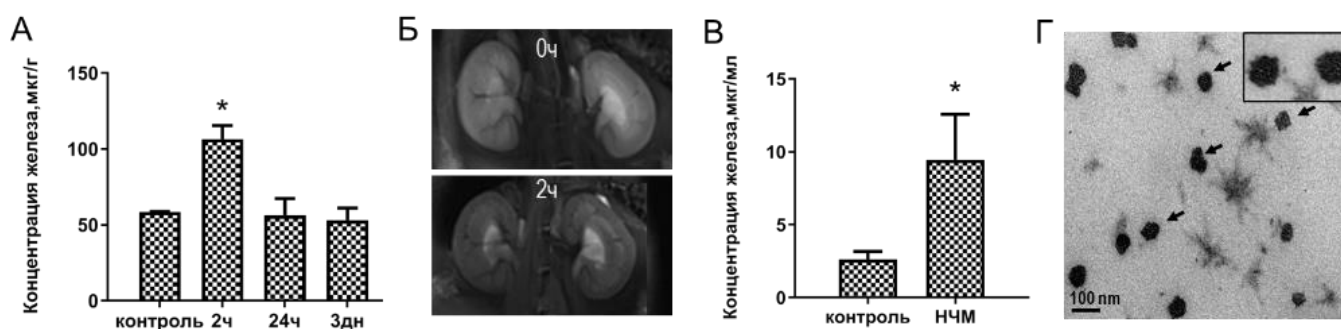


Рисунок 3. Накопление НЧМ в почках и выведение НЧМ с мочой. Концентрация железа в почках (А) и МРТ-изображения почек (Б) после внутривенного введения НЧМ. Концентрация НЧМ в моче (В) и электронная микроскопия осадка мочи (Г) после введения НЧМ. Стрелки указывают на НЧМ (вставка); * $p < 0.05$ (тест Даннета).

Для того чтобы понять причину почечной экскреции НЧ, более чем в 20 раз превышающих порог гломерулярного фильтра, проводили ИВМ поверхностного кортекса почки в момент введения НЧМ-Су5. Сразу после инъекции наблюдалось контрастирование частицами перитубулярных капилляров, а уже через 25 минут флуоресцентный сигнал локализовался преимущественно в почечных канальцах (Рисунок 4А, В). Примечательно, что на ранних этапах после введения препарата накопление происходило не в просвете, а в базальном компартменте тубулярного эпителия, что свидетельствует о том, что НЧМ не фильтруются через клубочки, а достигают эпителия со стороны тубулоинтерстиция. При введении свободного красителя наблюдали, что Су5 в течение нескольких минут исчезал из капилляров, временно накапливался в просвете канальцев и быстро выводился с мочой, не окрашивая почечный эпителий. Эти данные указывают на то, что накопление в базальном отделе почечного эпителия отражает поведение НЧМ, а не свободного красителя.

При дальнейшем наблюдении за судьбой НЧМ-Су5 в почках отмечали транзитное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в просвете почечных канальцев (Рисунок 4Б, Г). Трехмерная реконструкция тканей показала неравномерное распределение НЧ в тканях почек: некоторые канальца интенсивно накапливали краситель, в то время как другие – нет. Эти различия могут быть связаны с преимущественным накоплением НЧМ-Су5 в проксимальных, а не дистальных канальцах, как это было показано ранее для некоторых других типов НЧ.

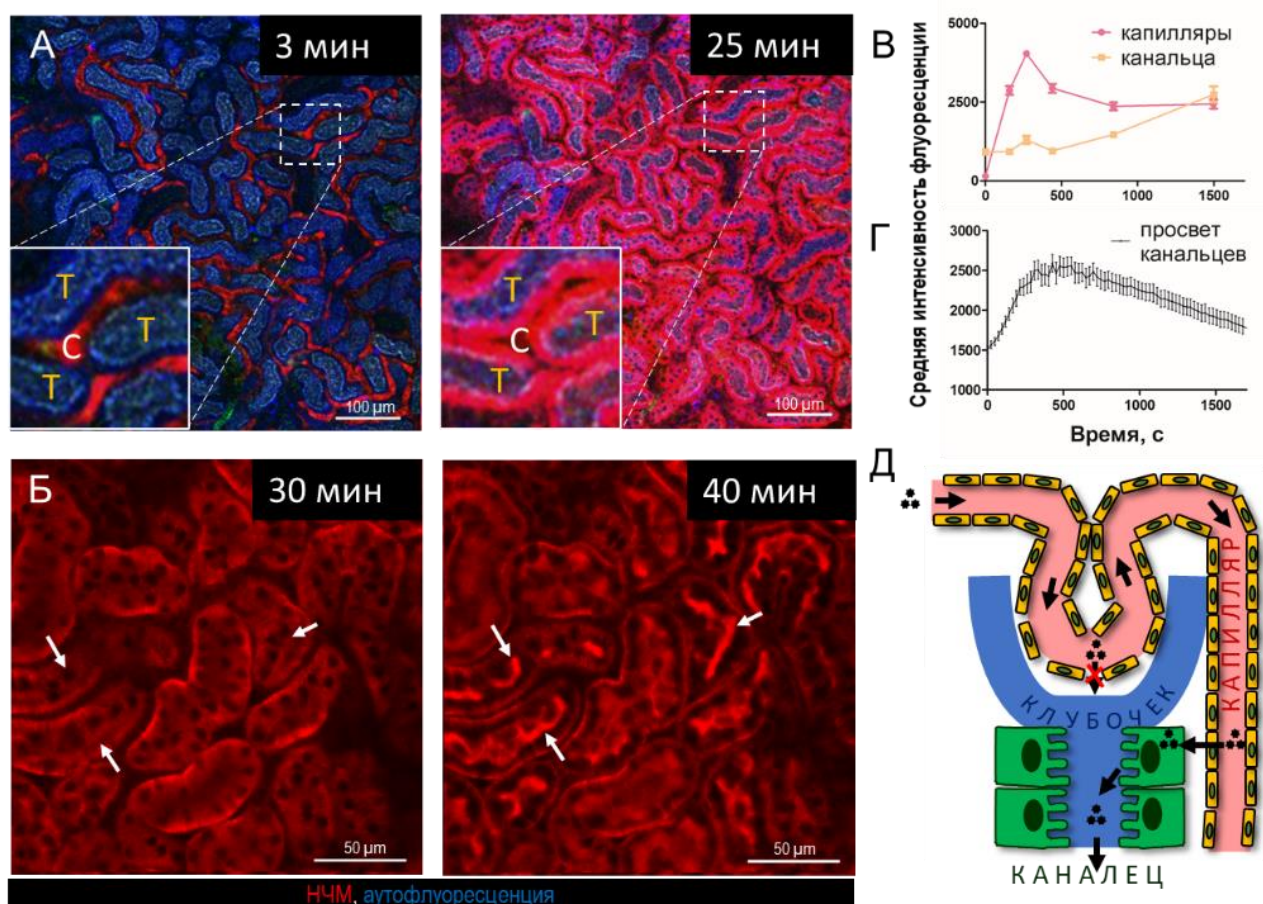


Рисунок 4. Механизм почечной экскреции НЧМ. Репрезентативные ИВМ-изображения поверхностного кортекса почки через 0-25 мин (А) и 30-40 мин (Б) после введения НЧМ-Су5. Т-канальца, С – капилляры, стрелки указывают на просвет канальцев. Изменение флуоресценции в капиллярах и канальцах (В), а также в просвете канальцев (Г) после введения НЧМ-Су5 (среднее \pm SEM). Д. Схематическое изображение пути выведения НЧМ с размером, превышающим порог гломерулярного фильтра.

Описанная динамика микрораспределения НЧМ указывает на то, что они попадают в эпителий канальцев путем трансмиграции через эндотелий капилляров и далее – через тубулоинтерстиций. Способность эндотелиальных и эпителиальных клеток к интернализации НЧМ была подтверждена в экспериментах *in vitro* на культурах клеток HUVEC и HEK293. Однако нельзя было исключить, что НЧМ-Су5 могут разрушаться в почках и освободившейся краситель

выводится быстрее, чем сами НЧМ. Чтобы проверить эту возможность, мы оценили долю выделяемого железа и долю выводимого флуоресцентного красителя в перерасчете на вводимую дозу и показали, что эти показатели не отличались. Приведенные данные свидетельствуют о том, что меченые комплексы сохраняют целостность *in vivo* от внутривенной инъекции до экскреции с мочой.

В совокупности, полученные результаты позволяют сделать вывод о существовании альтернативного пути выведения крупных НЧ через почки – транцитоза в перитубулярных отделах проксимальных почечных канальцев с последующим переносом через эндотелиоциты в просвет канальцев (Рисунок 4Д).

2.2. Исследование биораспределения липосом

Время полувыведения флуоресцентных липосом (ФЛ), измеренное с помощью ИВМ, составляло около 80 мин. Накопление липосом в органах соответствовало литературным данным: НЧ в основном накапливались в макрофагах печени и селезенки, в меньшей степени – в почках. Следует отметить, что в отличие от НЧМ, липосомы аккумулировались в почечных клубочках и не попадали в канальца.

2.3. Идентификация новой внеопухолевой клетки-мишени для вируса везикулярного стоматита

Исследование захвата ВВС-AF647 клетками крови проводили методом ИВМ и проточной цитометрии через 10 минут после системной инъекции. Среди всех лейкоцитов наибольшим сродством к вирусу обладали В-лимфоциты – около 40% клеток показали колокализацию с вирусным сигналом (Рисунок 5А-Б). Нейтрофилы, моноциты и CD8-лимфоциты также взаимодействовали с ВВС, однако процент захвата в этих популяциях оказался на порядок ниже (1-2%).

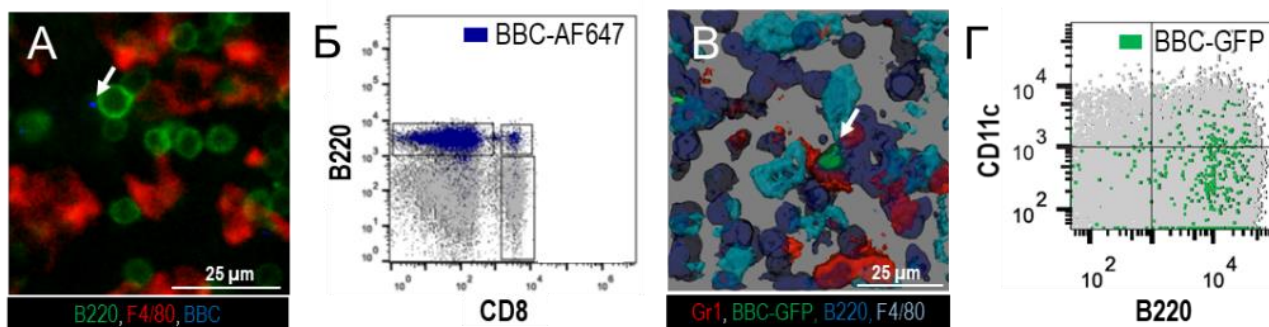


Рисунок 5. Взаимодействие вируса везикулярного стоматита с В-лимфоцитами. Репрезентативное ИВМ-изображение контакта ВВС с В-лимфоцитом (А, стрелка) и идентификация ВВС-связанных клеток крови методом проточной цитометрии (Б).

Репрезентативное изображение инфицированного В-лимфоцита (В; стрелка) и идентификация инфицированных спленоцитов методом проточной цитометрии (Г).

ИВМ селезенки позволила выявить связывание вируса с CD169+ металлофильными макрофагами маргинальной зоны, а также В-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами и нейтрофилами. Через 4-8 ч после введения ВВС-GFP была обнаружена экспрессия вирусного трансгена CD169+ макрофагами и дендритными клетками, что указывает на способность этих клеток поддерживать вирусную репликацию. Неожиданной находкой оказалось выявление инфицированных В-клеток, которые при этом сохраняли миграционную активность (Рисунок 5В). Проточная цитометрия подтвердила результаты ИВМ по инфицированию вирусом различных популяций спленоцитов (Рисунок 5Г).

Интересно, что через 48-72ч после инъекции возникала выраженная лейкопения, в основном за счет снижения числа В-лимфоцитов (B220+CD19+ клеток). Напротив, в селезенке отмечалось некоторое повышение численности популяции этих клеток. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что после захвата вируса В-клетки покидают кровотоки и направляются в лимфоидные органы. Идентификация В-клетки в качестве мишени для ВВС позволяет объяснить феномен быстрой доставки вируса в лимфатические узлы и фолликулы селезенки, в которых происходит транзитная репликация ВВС в CD169+ макрофагах и формирование противовирусного иммунитета.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЛЕЙКОЦИТОВ В ДОСТАВКЕ В ОПУХОЛЬ НАНОЧАСТИЦ И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

3.1. Роль нейтрофилов в доставке в опухоль наночастиц магнетита

Механизмы доставки НЧМ в опухоль изучали методом ИВМ в момент введения нанопрепаратов. Было показано, что НЧ могут преодолевать сосудистый барьер как путем пассивного транспорта (Рисунок 6Б, В), так и используя нейтрофилы в качестве «тroyанского коня» (Рисунок 6А, В). Последний механизм был впервые зафиксирован в режиме реального времени: НЧ адсорбируются на поверхности нейтрофила, который, выходя за пределы сосуда, переносит их в опухолевую ткань.

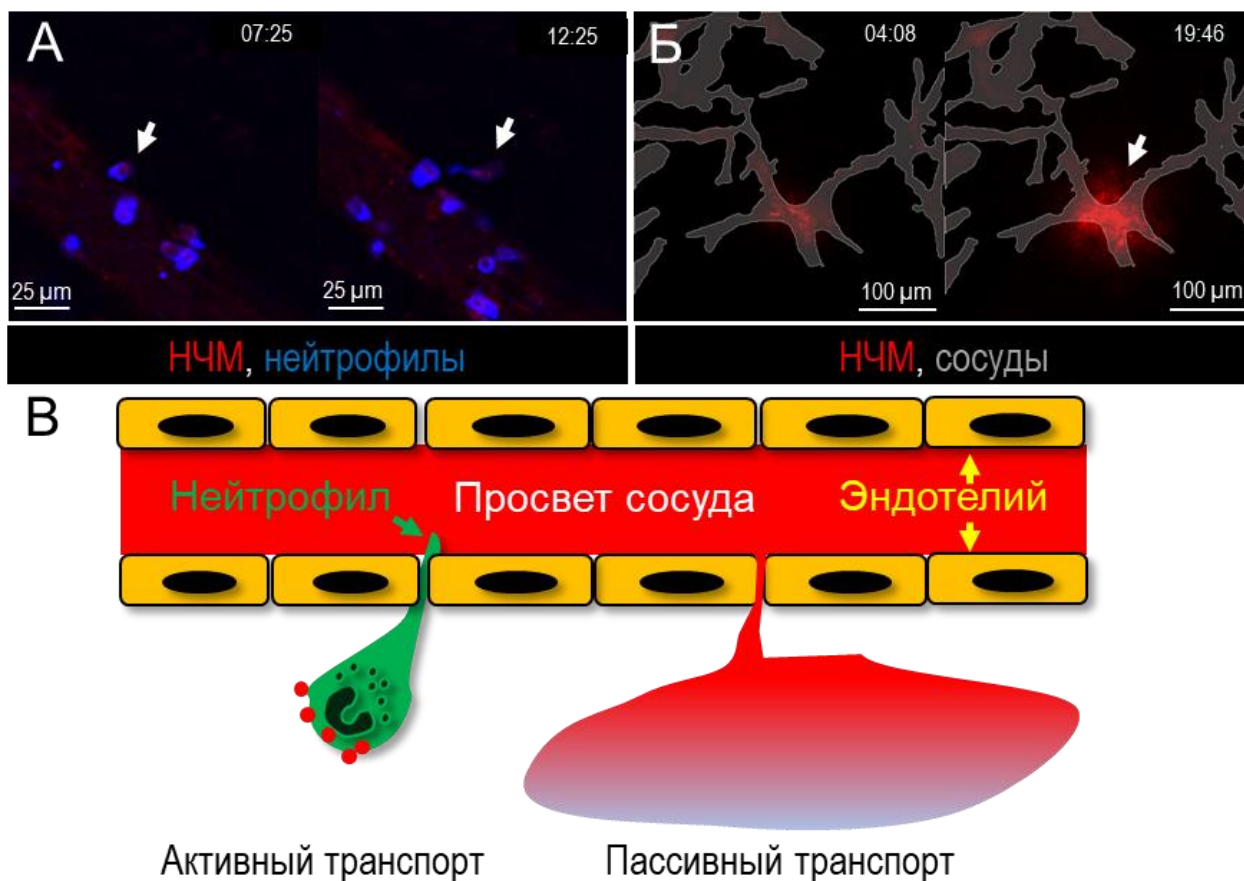


Рисунок 6. Механизмы экстравазации НЧМ в опухоли. А. Захват НЧМ нейтрофилом и перенос через стенку сосуда в опухоли. Б. Пассивная диффузия НЧМ из опухолевых сосудов в ткань. В. Схематическое изображение путей доставки НЧМ к опухолевым клеткам.

Для того чтобы оценить роль клеточно-ассоциированного механизма доставки, исследовали эффективность накопления НЧМ двух типов (кубической и кластерной формы) в опухоли 4Т1 после деплеции нейтрофилов. Транзиторная элиминация нейтрофилов достигалась путем внутрибрюшинного введения 250 мкг анти-Ly6G антител. Оценка накопления нанокубов и нанокластеров проводили с помощью МРТ, позволяющей визуализировать магнитные НЧ в опухоли в виде участков негативного контрастирования ткани. Интенсивность накопления НЧ кубической формы значительно снижалась в отсутствие нейтрофилов по сравнению с контролем, в то время как доставка в опухоль нанокластеров не отличалась у животных с деплецией нейтрофилов и без нее (Рисунок 7А). Эти результаты были подтверждены при количественном анализе накопления НЧМ при помощи параметра CNR (Contrast-to-Noise Ratio, отношение контраста к шуму; Рисунок 7Б).

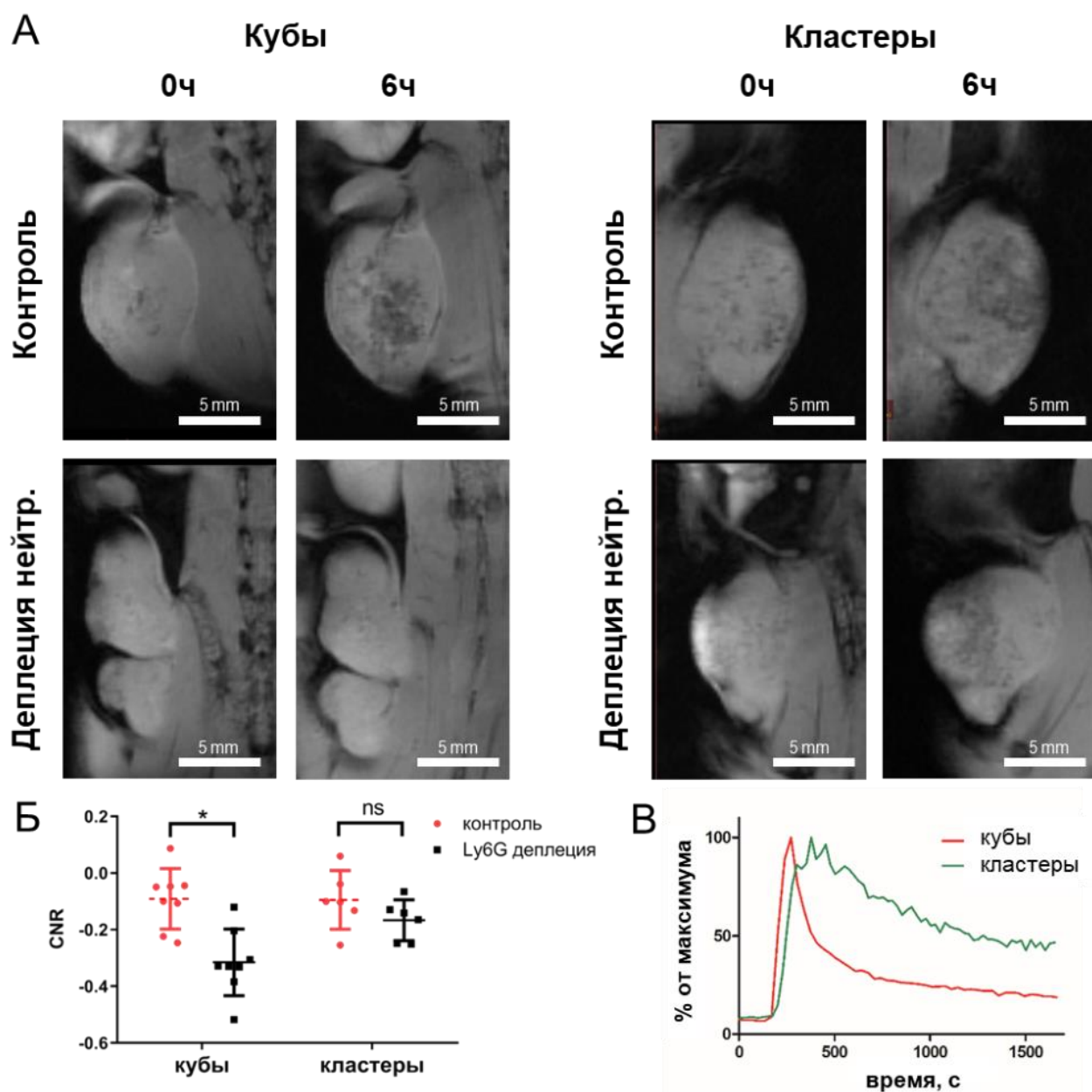


Рисунок 7. Роль нейтрофилов в доставке НЧМ в опухоль. Репрезентативные T2* МРТ-изображения опухолей 4Т1 после инъекции НЧМ кубической и кластерной формы (А) и значения показателя CNR в опухоли (Б) на фоне деплеции нейтрофилов и без нее (среднее \pm SD); * $p < 0.001$ (тест Тьюки). В. Динамика выведения из кровотока НЧМ кубической и кластерной формы.

Преобладание активного или пассивного транспорта для различных типов НЧ может быть связано с продолжительностью их циркуляции в кровотоке, так как увеличение количества пассажей НЧ через опухолевые сосуды повышает вероятность пассивных утечек. Действительно, было показано, что скорость выведения нанокубов в 5 раз выше, чем нанокластеров (Рисунок 7В), что согласуется с данными о том, что роль активного транспорта (нейтрофил-ассоциированного) для первых выше, чем для вторых.

Аналогичные эксперименты были проведены с использованием другой опухолевой модели – СТ26, для которой менее характерна активация и трансмиграция нейтрофилов, чем для 4Т1. Проточная цитометрия показала, что в крови животных с опухолями 4Т1 в 2 раза больше, а в опухоли – в 10 раз больше нейтрофилов, чем у животных с опухолями СТ26. При этом нанокубы значительно хуже накапливались в опухолях СТ26 (33%), чем в опухолях 4Т1 (80%, $p < 0.05$, критерий χ^2), а деплеция нейтрофилов в модели СТ26 не влияла на эффективность их доставки. Таким образом, роль клеточного транспорта оказалась выше в опухолях с высокой степенью нейтрофильной инфильтрации.

Наличие нейтрофил-ассоциированного транспорта позволяет объяснить феномен замедленного накопления в опухоли, который был характерен для НЧМ: несмотря на быстрое время полувыведения (3-15 мин), максимальное накопление в опухоли наблюдалось через 6-24ч. По всей видимости, задержка в детекции сигнала в опухоли связана с тем, что реализация активного транспорта требует более длительного времени (по сравнению с пассивными утечками) для миграции клеток в опухоль и их выхода из сосудов.

3.2. Роль нейтрофилов в доставке в опухоль липосом

С помощью ИВМ впервые было показано наличие двух различных типов экстравазации ФЛ в опухолях. Чаще всего выявляли локальные утечки в периваскулярную область, которую мы назвали микроутечками (Рисунок 8А). Для этого типа экстравазации характерны ограниченная площадь утечки и глубина проникновения не более 20 мкм от сосудов. Интенсивность флуоресценции была равномерной внутри микроутечки и значительно превосходила таковую в просвете сосуда. Формирование микроутечек обычно происходило быстро (в течение нескольких минут) и в дальнейшем зона микроутечки практически не изменялась (Рисунок 8В).

Другой, более редкий тип утечки (Рисунок 8Б), охватывал обширную область интерстиция, проникая глубоко в ткани (на сотни микрон). Эти *макроутечки* были нестабильны в пространстве и во времени, демонстрируя градиент диффузии и динамические изменения в интенсивности сигнала, который, однако, никогда не превышал интенсивности флуоресценции циркулирующих липосом (Рисунок 8Г). Кроме того, мы наблюдали повторные волны экстравазации ФЛ из одного и того же локуса макроутечки. В отличие от микроутечки, этот тип экстравазации, по всей видимости, отражает диффузию НЧ в интерстициальном пространстве. Волны диффузии липосом всегда распространялись из центра опухоли на периферию, вероятно, из-за более высокого внутритканевого давления внутри опухоли.

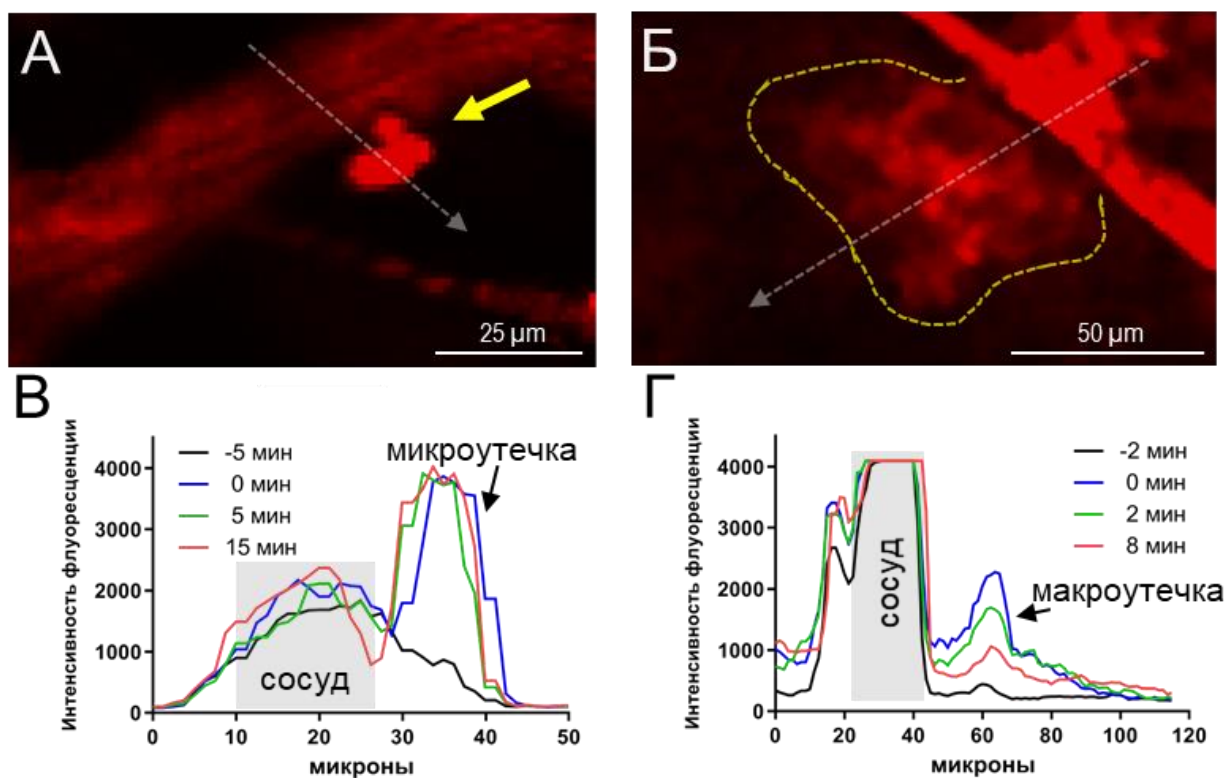


Рисунок 8. Микро- и макроутечки липосом в опухоли. Репрезентативные примеры микроутечки (А, желтая стрелка) и макроутечки (Б, желтая пунктирная линия). В-Г Профили флуоресцентного сигнала, записанные в динамике вдоль вектора, указанного пунктирными стрелками на А-Б.

Чтобы учесть гетерогенность опухолей, мы изучали экстравазацию липосом на 4 моделях опухолей: подкожно имплантированной опухоли молочной железы 4Т1 мыши (гетеротопической), мышинной меланоме В16, опухоли предстательной железы человека 22Rv1, а также опухоли 4Т1, имплантированной в жировую ткань молочной железы (ортотопической). В качестве контроля исследовали дорсальную кожу животных без опухолей. Микроутечки наблюдали у 100% исследуемых животных как в здоровой коже (Рисунок 9А), так и в опухолях (Рисунок 9Д-З).

В опухолях 4Т1 и В16 микроутечек было больше, чем в здоровых сосудах, однако даже в нормальных тканях их плотность была довольно высокой – около 20 на 1 мм² (Рисунок 9И). Напротив, макроутечки были редким явлением и выявлялись преимущественно в опухолях 4Т1 (Рисунок 9Б-В) и реже в опухолях В16 (Рисунок 9Г), при этом наблюдалась значительная вариабельность между животными, а среднее количество таких утечек не превышало ≈ 1.2 на 1 мм² (Рисунок 9К).

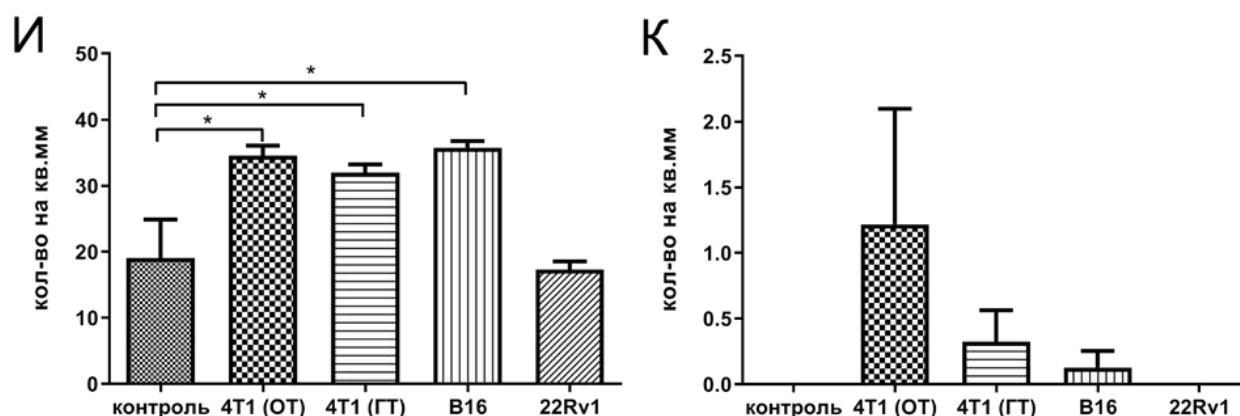
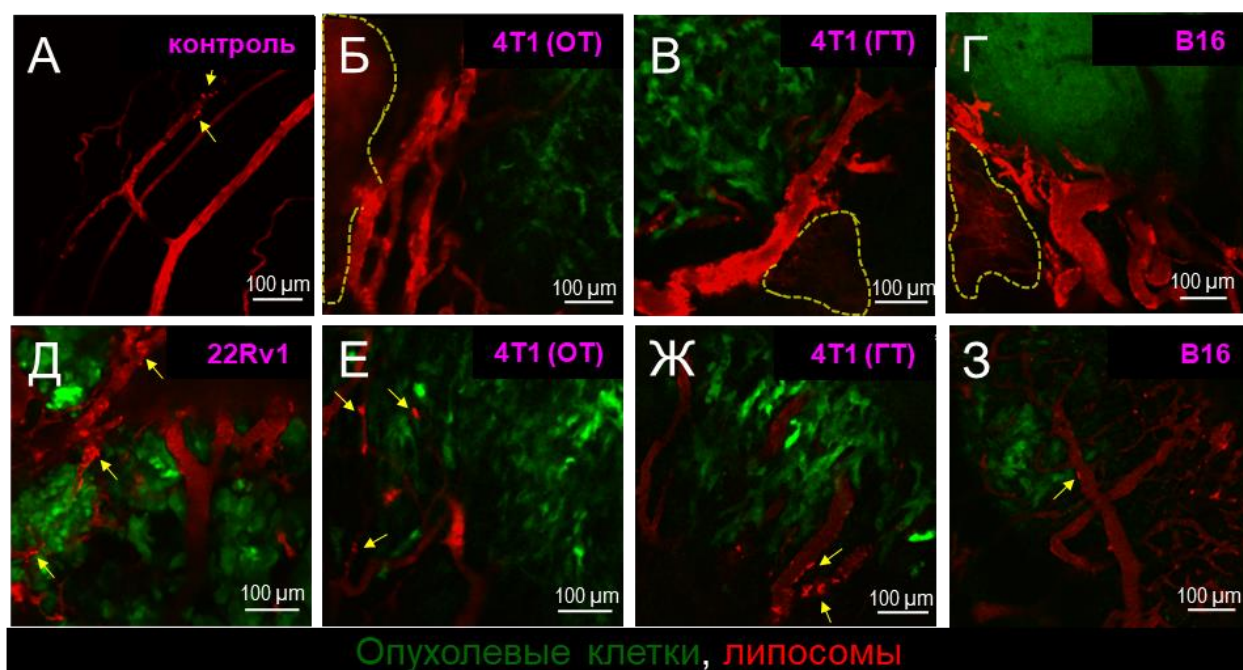


Рисунок 9. Микро- и макроутечки в опухолях разного гистологического типа. Механизмы экстравазации липосом в нормальных сосудах (А), ортотопических (ОТ; Б, Е) и гетеротопических (ГТ; В, Ж) опухолях 4Т1, а также в моделях В16 (Г, З) и 22Rv1 (Д): микроутечки (А, Д-З, стрелки) и макроутечки (Б-Г, пунктирные линии). Количественная оценка микро- (И) и макро- (К) утечек в опухолевых и нормальных тканях (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, тест Даннета).

В некоторых сосудах мы наблюдали образование микроутечек уже во время первого пассажа липосом с кровотоком, но чаще они развивались через 10-20 мин после инъекции. Распределение утечек было неоднородным не только между изученными моделями, но также и между различными участками одной и той же опухоли, при этом в некоторых сосудах были обнаружены множественные микроутечки, тогда как в других – незначительное количество локусов экстравазации или даже их полное отсутствие.

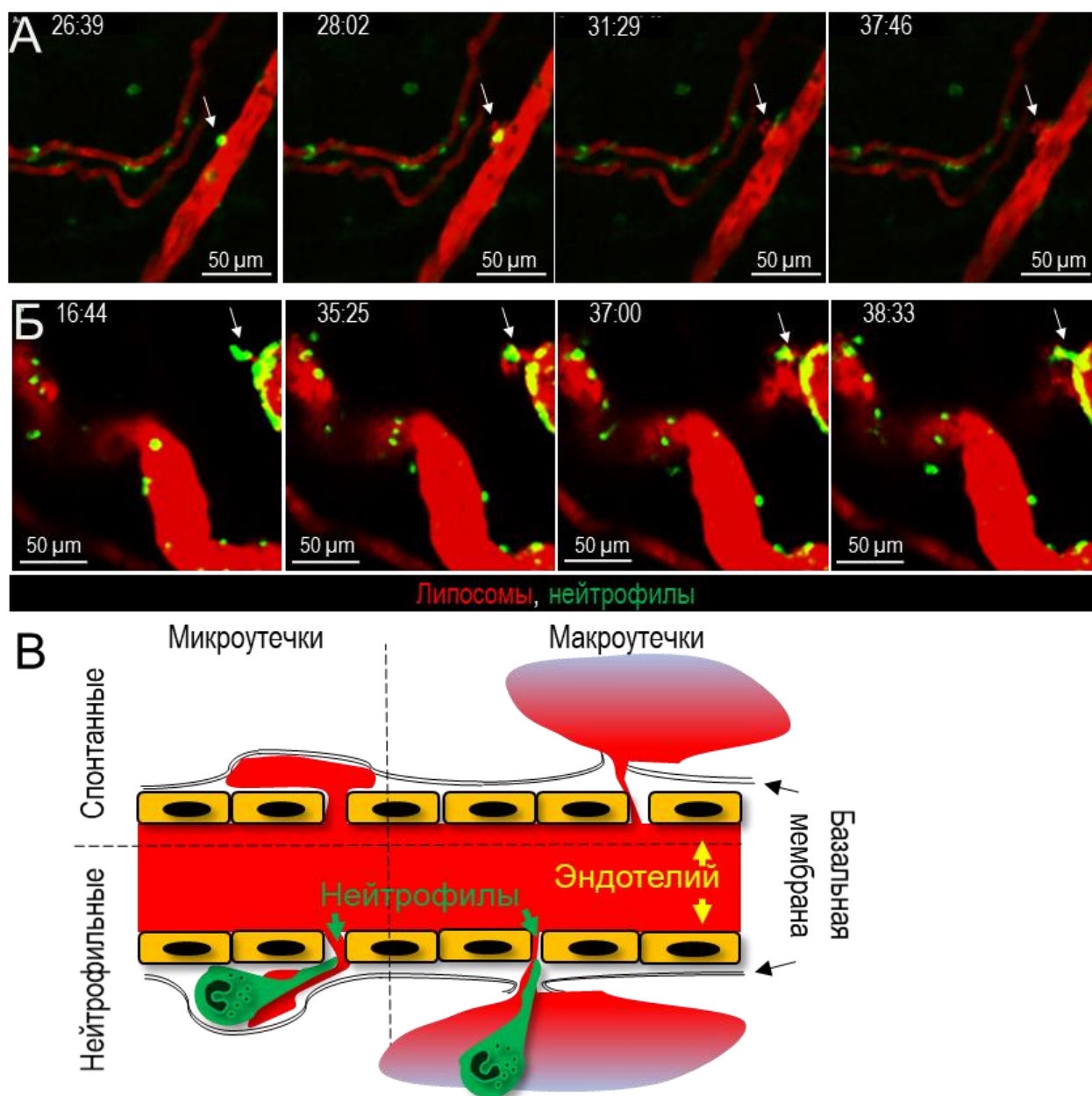


Рисунок 10. Механизмы экстравазации липосом в опухоли. Формирование микроутечки (А, стрелка) и макроутечки (Б, стрелка) в локусе экстравазации нейтрофила. В. Схематическое изображение путей доставки липосом в опухолевую ткань.

При изучении динамики формирования микроутечек в режиме реального времени было отмечено, что в некоторых случаях они возникают в локусах экстравазации нейтрофилов (Рисунок 10А). Аналогично, были зафиксированы макроутечки, образующиеся вслед за выходом нейтрофила из сосуда (Рисунок 10Б).

Следует отметить, что в отличие от НЧМ, липосомы не захватывались нейтрофилами, поэтому описанные примеры нейтрофил-опосредованных утечек представляют собой

принципиально новый механизм доставки НЧ: липосомы выходят за пределы сосуда не на нейтрофиле, а через поры сосудистого барьера, временно открывающиеся в момент трансмиграции клеток. В результате, можно говорить о 4-х механизмах доставки липосом в опухоль: спонтанно образующихся и нейтрофил-зависимых микро- и макроутечках (Рисунок 10В).

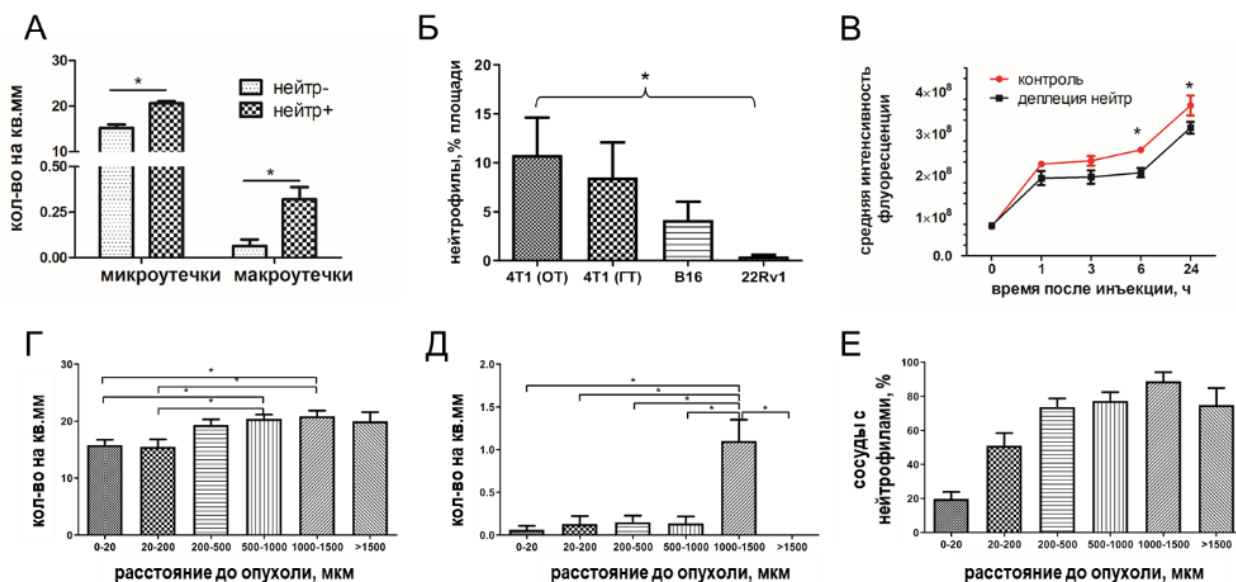


Рисунок 11. Роль нейтрофилов в доставке липосом в опухоль. А. Количественный анализ микроутечек и макроутечек в сосудах с нейтрофильной инфильтрацией и без нее (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, непарный t-тест). Б. Количественная оценка нейтрофильной инфильтрации в опухолях различного гистологического типа (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, пост-тест на линейный тренд). В. Количественный анализ накопления ФЛ в опухолях 4Т1 на фоне деплеции нейтрофилов и без нее (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, тест Бонферрони). Количественная оценка микро- (Г) и макроутечек (Д), происходящих на разном расстоянии от края опухоли (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, тест Тьюки). Е. Процент сосудов, инфильтрированных нейтрофилами, на разном расстоянии от края опухоли (среднее \pm SEM).

О роли нейтрофилов в экстравазации липосом свидетельствует более высокая плотность микро- и макроутечек в сосудах с нейтрофильной инфильтрацией (Рисунок 11А). Хотя количество нейтрофилов статистически значимо не отличалось между различными моделями опухолей, была выявлена положительная корреляция между частотой макроутечек и инфильтрацией нейтрофилов в исследуемых моделях (ср. Рисунок 9К и Рисунок 11Б). Чтобы количественно оценить вклад нейтрофилов в доставку нанопрепаратов проводили исследование опухолевого накопления липосом методом IVIS у животных после деплеции нейтрофилов. Как видно на рисунке 11В, при отсутствии нейтрофилов интенсивность флуоресценции в опухолях была на 20-30% ниже на протяжении 24ч после инъекции по сравнению с контрольной группой животных.

Чтобы учесть другие факторы, которые могут влиять на уровень экстравазации ФЛ, мы измеряли диаметр сосуда и расстояние до опухолевых клеток для каждого отдельного локуса утечки. Неожиданно, частота экстравазации липосом оказалась выше в околоопухолевых сосудах, а не внутри опухоли. Так, количество микроутечек было выше в сосудах, находящихся на расстоянии 500-1500 мкм от края опухоли, по сравнению с сосудами, непосредственно прилегающими к опухолевым клеткам (Рисунок 11Г), а частота макроутечек была максимальной на расстоянии 1000-1500 мкм от опухоли. (Рисунок 11Д). Следует отметить, что количество сосудов, инфильтрированных нейтрофилами, также возрастало с увеличением расстояния от центра опухоли (Рисунок 11Е). Эти результаты позволяют предположить, что накопление липосом в перитуморальной области может быть связано с нейтрофил-ассоциированными утечками.

3.3. Роль нейтрофилов в доставке в опухоль онколитических вирусов

Роль нейтрофилов в распространении вирусной инфекции в опухоли оказалась неоднозначной. С одной стороны, было показано, что нейтрофилы способны захватывать и доставлять в опухоль вирионы. С другой стороны, эти клетки способствовали сдерживанию распространения инфекции в опухоли. Для ВВС ингибирующее воздействие нейтрофилов на вирусную инфекцию преобладало над вкладом этих клеток в доставку вирионов к опухоли (Рисунок 22).

4. ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ДЛЯ НАНОЧАСТИЦ И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ В ОПУХОЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ

4.1 Опухолевый перицит – новая мишень для онколитических вирусов

Исследуя опухоль молочной железы 4Т1 методом ИВМ через 6-8 ч после введения ВВС-GFP, мы обнаружили интересный, ранее не описанный феномен: экспрессию вирусного трансгена выявляли не в опухолевых клетках, а в периваскулярных клетках, морфологически сходных с перицитами (Рисунок 12). Примечательно, что такую картину наблюдали во всех восьми исследованных моделях: в опухолях молочной железы 4Т1 и ЕМТ6, толстого кишечника СТ26 и СТ26-mut, рабдомиосаркомах 76-9 и М3-9-М, меланоме В16 и нейробластоме Neuro2a (Рисунок 12). Эти данные указывают на высокую распространенность инфицирования не-опухолевых периваскулярных клеток при виро-терапии различных типов опухолей.

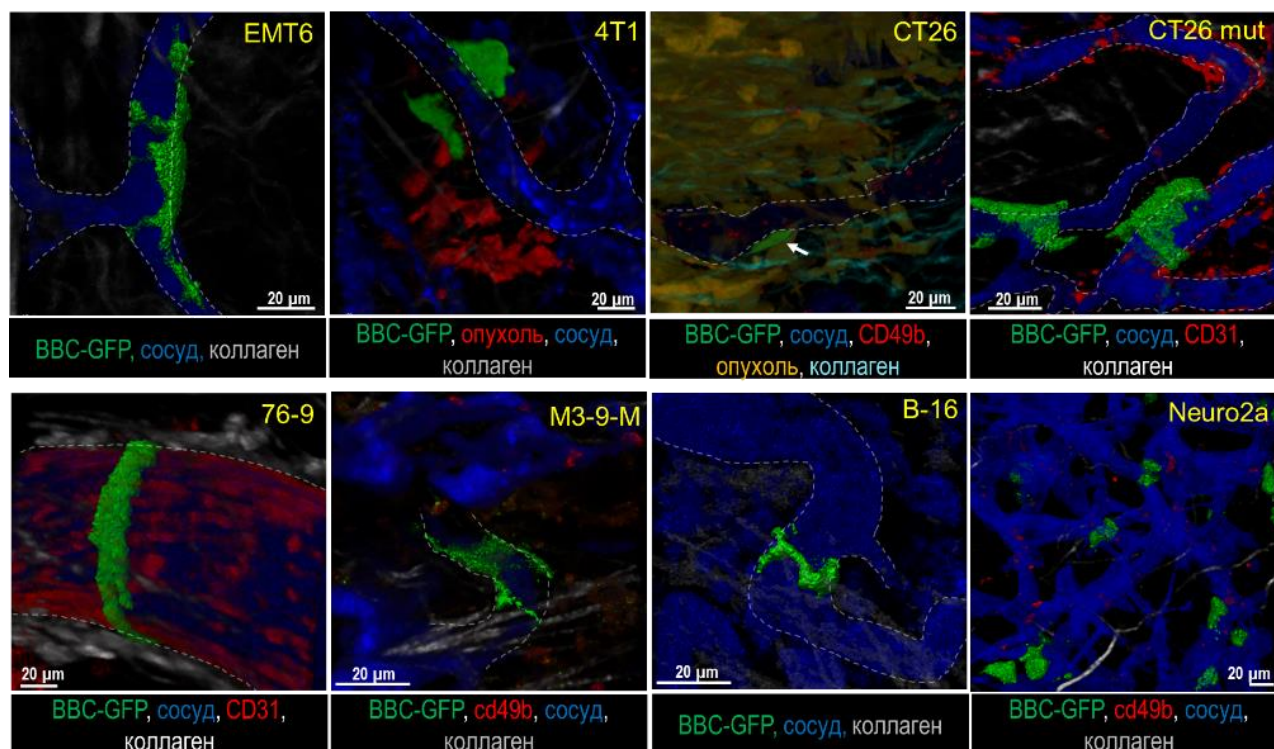


Рисунок 12. Инфицирование периваскулярных клеток в различных опухолевых моделях при внутривенном введении ВВС.

Учитывая морфологические и топологические особенности инфицированных клеток, можно было предположить, что эти клетки – перициты, периваскулярные макрофаги или эндотелиальные клетки. Иммунофенотипирование инфицированных клеток проводили методом иммуногистохимии. Для детекции перицитов использовали антитела к NG2, α SMA, PDGFr- β и десмину; также в исследование были включены маркеры, специфичные для макрофагов (F4/80, CD68, CD169) и эндотелиоцитов (CD31). Была показана колокализация вирусного сигнала с маркерами перицитов, при этом не выявлено инфицирования эндотелиальных клеток и макрофагов. Для дальнейшего подтверждения природы инфицированных клеток, проводили ИВМ сосудов опухоли 76-9, которую имплантировали трансгенным животным C57bl/6- α SMA-DS-Red и C57bl/6-NG2-DS-Red. Результаты указанных экспериментов убедительно показали, что вирус инфицирует клетки, экспрессирующие маркеры α SMA (Рисунок 13А-Б) и NG2 (Рисунок 13В-Г). В совокупности морфологические, топологические и иммунофенотипические характеристики этих клеток позволяют идентифицировать их как перициты.

In vitro исследования показали, что перициты чувствительны к широкому спектру вирусов, включая онколитические рабдовирусы (ВВС, Мараба, Фармингтон), реовирус и лентивирус. Учитывая эти результаты, мы провели дополнительные эксперименты, где сосуды опухоли

изучали методом ИВМ после внутривенной инъекции вируса Мараба (Рисунок 14А), осповакцины (Рисунок 14Б), аденоассоциированного вируса (ААВ, Рисунок 14В) и внутриопухолевой инъекции реовируса (Рисунок 14Г).

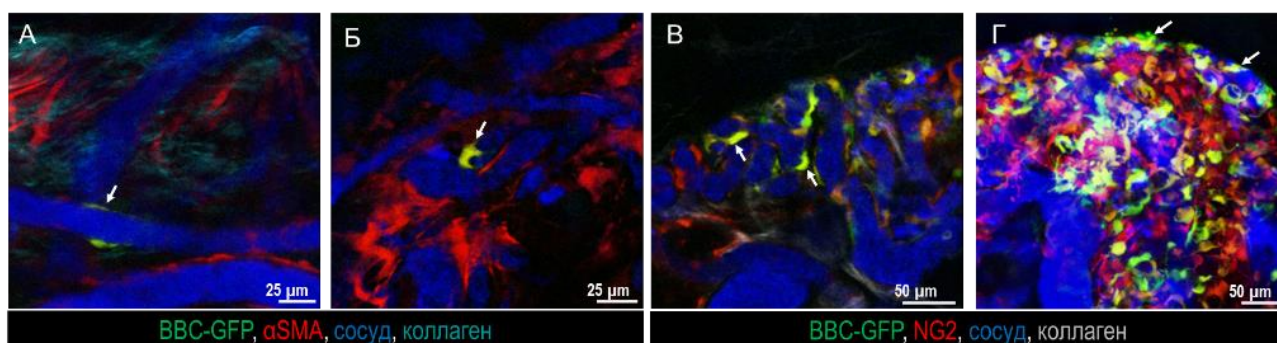


Рисунок 13. Идентификация клеток, инфицированных ВВС. ИВМ опухолей 7-69, имплантированных животным C57bl/6-αSMA-DS-Red (А-Б) и C57bl/6-NG2-DS-Red (В-Г). Стрелки указывают на инфицированные перicyты.

Несмотря на то, что перечисленные вирусы относятся к 4-м разным семействам (Rhabdoviridae, Poxviridae, Reoviridae и Parvoviridae), во всех случаях были выявлены инфицированные перicyты. Таким образом, инфекция этих клеток происходит не только в опухолях разного гистологического типа, но и при использовании широкого спектра ОВ.

Следует отметить, что наряду с перicyтами были обнаружены также и другие клетки опухолевого микроокружения, чувствительные к ВВС. Так, в трех из восьми опухолевых моделей мы наблюдали инфицирование опухолевых клеток. Более редкими находками были инфицированные фибробласты, эндотелиоциты и внутрисосудистые лейкоциты – они встречались в 12.5% (1/8) исследованных опухолевых моделей. Таким образом, перicyт не является единственной мишенью для ОВ, но именно эти клетки наиболее часто (в 100% моделей) оказываются чувствительными к инфекции.

Примечательно, что перicyты вокруг нормальных сосудов здоровых тканей оказались не чувствительны к вирусной инфекции. Однако инфекцию этих клеток наблюдали также в модели заживления раны, что указывает на возможный механизм повышенной чувствительности перicyтов к вирусам. При заживлении раны, как и в опухоли, активируется процесс неоангиогенеза, который сопровождается быстрым формированием сосудов с дефектной эндотелиальной выстилкой, повышенной концентрацией таких факторов как VEGF, PDGF, а также формированием локальной иммуносупрессии.

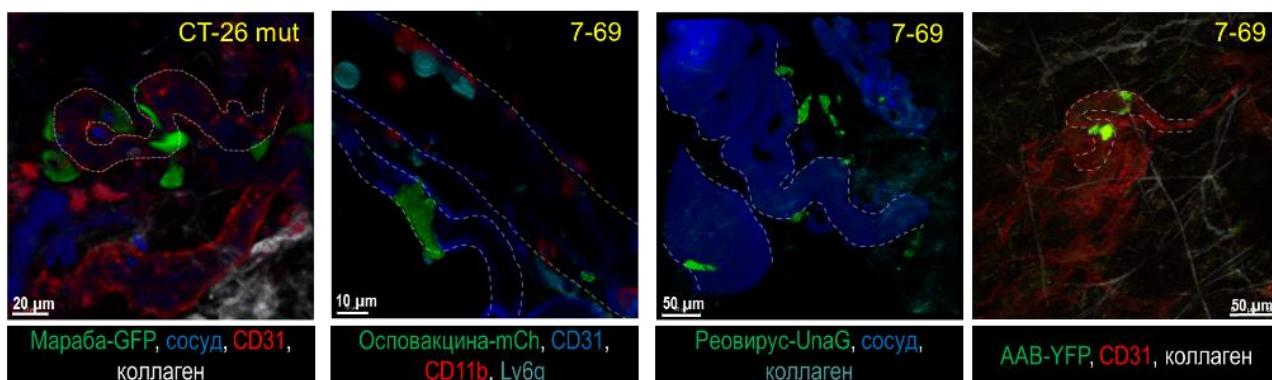


Рисунок 14. Инфицирование опухолевых пероцитов разными онколитическими вирусами.

ИВМ-исследования показали, что инфицированный пероцит не является источником инфекции для опухолевых клеток, не участвует в привлечении в опухоль клеток иммунитета и не вызывает коллапса опухолевых сосудов. Пока остается не ясным, какую роль играет инфицирование опухолевых пероцитов в онколитической виротерапии.

4.2. Клетки-мишени для наночастиц в опухолевом микроокружении

Анализ клеток мишеней для НЧ различного типа проводили методом ИВМ через 1-6ч после введения флуоресцентно-меченных препаратов. Было показано, что НЧ магнетита преимущественно захватываются нейтрофилами, в то время как НЧ маггемита – моноцитами и макрофагами (Рисунок 15А). Флуоресцентно-меченные липосомы и липосомальный доксорубин накапливались в клетках, морфологически сходных с пероцитами (Рисунок 15Б-В), а также в макрофагах.

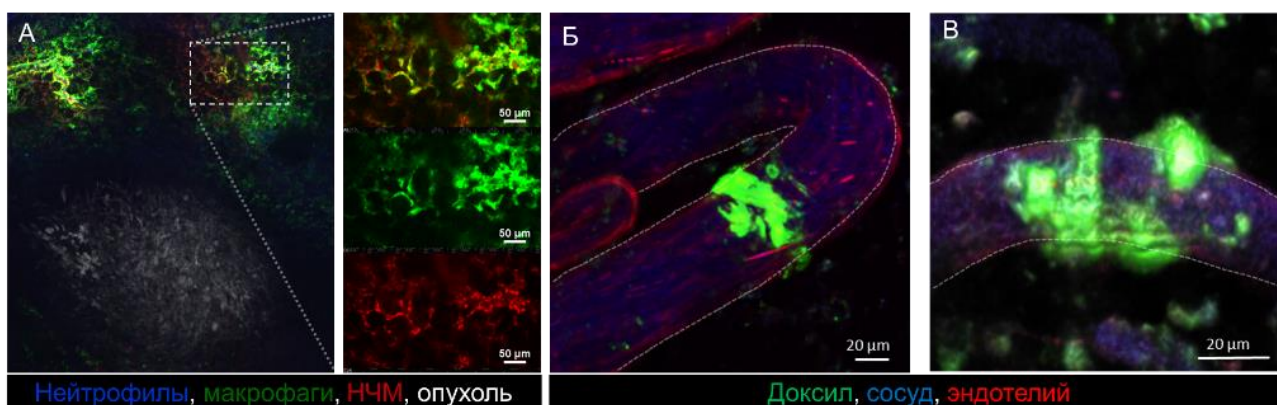


Рисунок 15. Выявление клеток-мишеней для НЧ в опухолевом микроокружении. А. Накопление НЧМ в опухолевых макрофагах. Б-В. Накопление липосомального доксорубина в периваскулярных клетках.

Следует отметить, что во всех опухолевых моделях и для всех типов исследованных НЧ колокализацию НЧ с опухолевыми клетками наблюдали крайне редко. Эти результаты свидетельствуют о том, что НЧ малоэффективны для непосредственной доставки цитотоксических препаратов к опухолевым клеткам, но могут быть использованы для селективного воздействия на клетки опухолевого микроокружения.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ В КЛИНИЧЕСКИ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СХЕМАХ ТЕРАПИИ

5.1 Исследование доставки липосом при их повторном введении

Особенности биораспределения повторной дозы липосом изучали с помощью методов флуоресцентной микро- и макроскопии. В качестве первой дозы вводили немеченные липосомы, а через 24ч – ФЛ-DiD. Было показано, что время полувыведения и профили накопления первой и второй дозы липосом в органах и в опухолях не отличаются. Количественный анализ не выявил различий между частотой захвата липосом лейкоцитами крови: как первая, так и вторая доза липосом в основном связывались с моноцитами, реже – с нейтрофилами и CD4-лимфоцитами и практически не взаимодействовали с CD8-лимфоцитами и В-клетками. Не отличалась также картина захвата двух доз клетками опухолевого микроокружения: в обоих случаях выявляли ассоциацию липосом с нейтрофилами и макрофагами, в меньшей степени – с другими лейкоцитами и опухолевыми клетками. Взаимодействие НЧ с иммунными клетками в некоторых случаях может изменять состав популяции лейкоцитов, приводя к тому, что последующая доза препарата встречается с потенциально другим микроокружением. Однако количественный состав лейкоцитов крови и опухоли на момент введения первой и второй дозы липосом оказался неизменным.

Как и в случае с однократным введением препарата, вторая доза липосом попадала в опухоль за счет микро- и макроутечек. На рисунке 16А-Б видно, что повторная доза повторяет как динамику, так и степень накопления в опухоли первой дозы липосом. Для того чтобы напрямую оценить пространственное накопление двух доз в опухоли, проводили эксперименты, в которых первая и вторая доза липосом были связаны с разными красителями. Через 48ч/24ч после введения ФЛ-DiO/ФЛ-DiD была показана высокая степень колокализации двух флуоресцентных сигналов (Рисунок 16В), которая сохранялась при обратном порядке введения препаратов (ФЛ-DiO через 24ч после ФЛ-DiD).

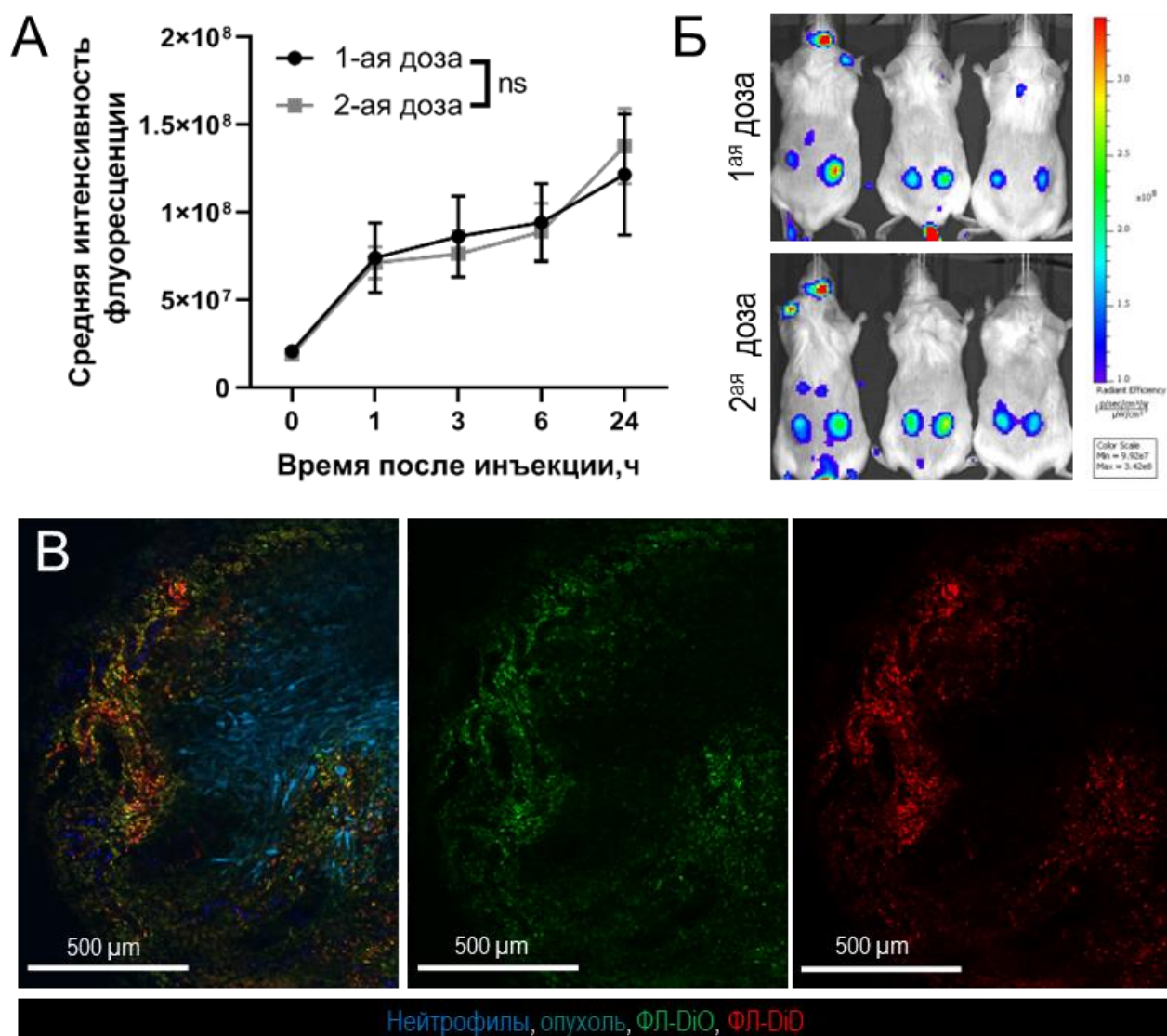


Рисунок 16. Накопление в опухоли первой и второй дозы липосом. Количественный анализ (А) и репрезентативные изображения (Б) накопления в опухолях 4Т1 первой и второй дозы ФЛ. (среднее ± SEM; двусторонний ANOVA) В. ИВМ изображение опухоли через 48ч/24ч после инъекции ФЛ-DiO/ФЛ-DiD.

Отсутствие отличий между поведением в организме двух доз липосом открывает возможность использования первой дозы в качестве диагностической для целенаправленного отбора опухолей с хорошим накоплением НЧ, которые должны также хорошо аккумулировать вторую (терапевтическую) дозу липосом. Для того чтобы проверить эту гипотезу, использовали липосомы, содержащие 5-нм НЧ маггемита, которые можно детектировать в опухоли методом МРТ; в качестве терапевтического препарата был использован липосомальный доксорубицин (Келикс). ИВМ показала, что ни загрузка в липосомы магнитно-контрастного диагностикума, ни

наличие в них лекарственного препарата не нарушают высокой степени колокализации двух доз липосом в опухоли (Рисунок 17).

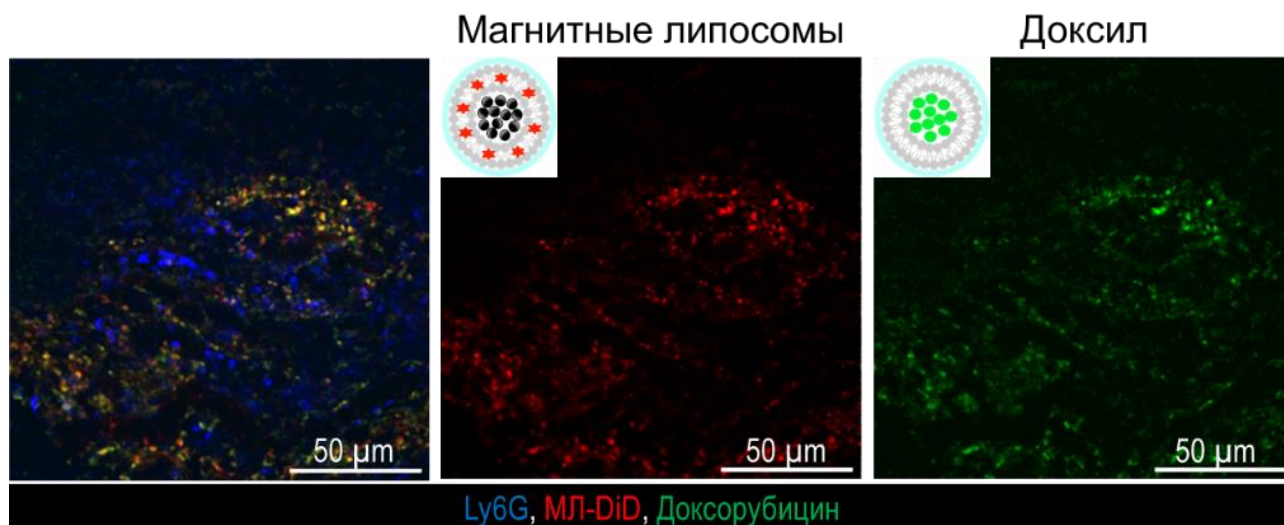


Рисунок 17. Накопление в опухоли магнитных липосом и липосомального доксорубицина

Безопасность магнитных липосом была продемонстрирована в тестах *in vitro* и *in vivo* токсичности, а также путем анализа динамики основных биохимических показателей крови, который не выявил отклонений от нормы после внутривенного введения препаратов.

МРТ-исследование опухолей подтвердило, что, начиная с 6ч после инъекции, МЛ визуализируются в опухоли 4Т1 в виде участков негативного контрастирования. В качестве критерия эффективности накопления была выбрана медиана разности интенсивности сигналов (ΔSI), регистрируемых на МРТ до и через 6ч после системного введения липосом. Данный параметр был вычислен по результатам МРТ-исследования 62 животных с опухолями 4Т1. На рисунке 18Б приведены репрезентативные изображения опухолей с высоким и низким уровнем накопления МЛ (ΔSI выше или ниже медианы, соответственно).

Через 24ч после стратификации опухолей по уровню накопления диагностикума, обе группы животных получали 4 внутривенные инъекции Келикса или свободного доксорубицина с интервалом в 3-4 дня (Рисунок 18А). На рисунке 18В-Г видно, что в группе с высоким накоплением МЛ наблюдали более выраженное снижение скорости роста опухолей и увеличение выживаемости по сравнению с группой, показавшей низкий уровень накопления МЛ в опухоли, а также по сравнению с контролем. Следует отметить, что при лечении свободным доксорубицином не было выявлено отличий в скорости опухолевой прогрессии между группами с высоким и низким накоплением МЛ (Рисунок 18Д-Е).

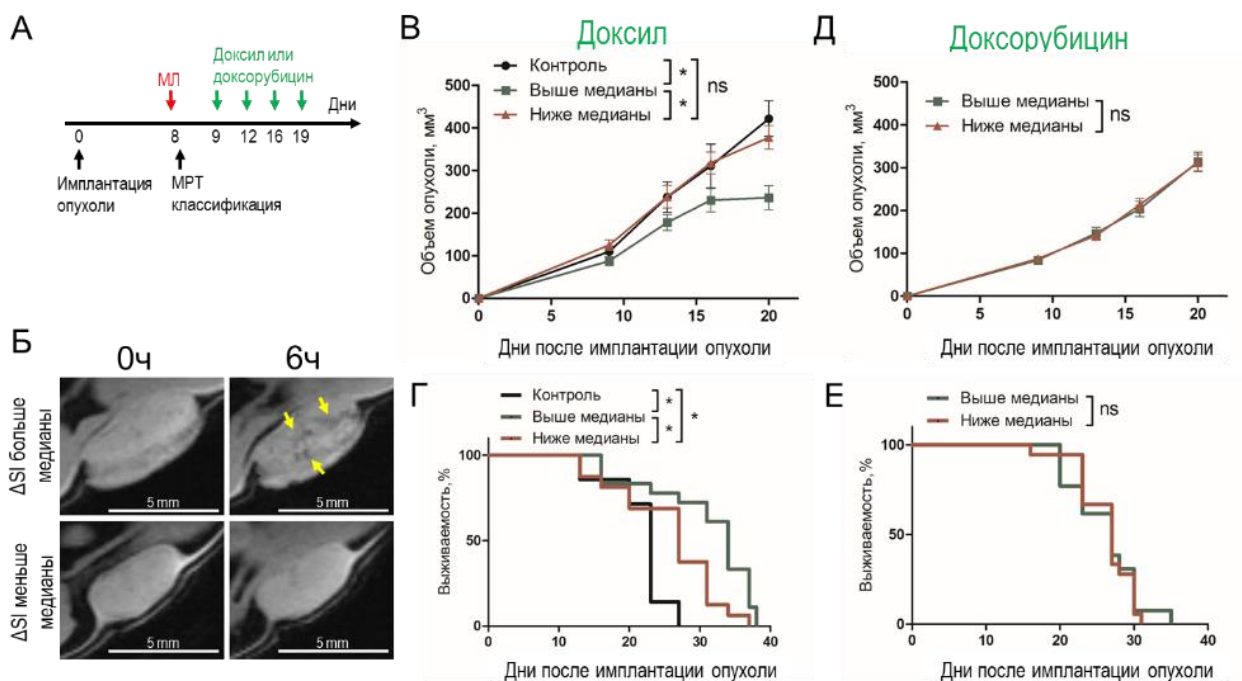


Рисунок 18. Оценка терапевтической эффективности липосомального и свободного доксорубина в опухолях с разным уровнем накопления МЛ. А. Схема эксперимента по оценке прогностического потенциала МЛ. Б. Репрезентативные изображения опухолей с высокой (стрелки) и низкой степенью накопления МЛ. Динамика опухолевого роста при лечении липосомальным (В) или свободным (Д) доксорубином (среднее \pm SEM; * $p < 0.05$, двусторонний ANOVA). Кривые выживаемости при лечении липосомальным (Г) или свободным (Е) доксорубином (* $p < 0.05$, лог-ранк тест).

Данные результаты свидетельствуют о том, что оценка накопления в опухоли магнитных липосом позволяет прогнозировать терапевтическую эффективность липосомальных препаратов, но не их свободных аналогов.

5.2 Исследование доставки и механизмов противоопухолевой активности вируса везикулярного стоматита при повторном введении

Оценку опухолевой инфекции, возникающей при внутривенном введении ВВС, оценивали с использованием двух вирусных конструкций: ВВС со встроенными генами GFP/FLUC и ВВС без репортерных трансгенов (ВВС-NR). Чтобы определить специфический вклад в инфекцию первой дозы, животных инфицировали вирусом ВВС-GFP/FLUC, а через 48ч вводили ВВС-NR. Для оценки инфекции, вызванной второй дозой была использована обратная последовательность введения вирусных конструкций. Методом билюминесценции было показано, что инфицирующий потенциал второй дозы снижается на 2 порядка по сравнению с первой инъекцией вируса (Рисунок 19А-Б). Аналогичные данные были получены при анализе экспрессии вирусного

трансгена в опухоли методом ИВМ (Рисунок 19Е). Однако, отсутствие второй дозы вируса приводило к снижению биолюминесценции в опухоли в 2-3 раза (Рисунок 19В-Г) и значительному падению инфекционного титра вируса в опухоли (Рисунок 19Д). Важно отметить, что две дозы ВВС были более эффективны в замедлении опухолевого роста и повышении выживаемости, по сравнению с одной дозой (Рисунок 21Д-Е). В другой опухолевой модели (М3-9-М) двукратная схема терапии также давала терапевтические преимущества, по сравнению с однократным введением ВВС, но при этом вторая доза не инфицировала опухолевые клетки. Эти результаты предполагают, что несмотря на то, что инфицирующая способность второй дозы крайне мала, повторное введение вируса увеличивает распространение и длительность инфекции, вызванной первой дозой. Примечательно, что вторая доза не способна инфицировать не только опухоль, но и лимфоидные органы – селезенку и лимфатические узлы, для которых характерна выраженная экспрессия вирусного трансгена при системном введении первой дозы ВВС.

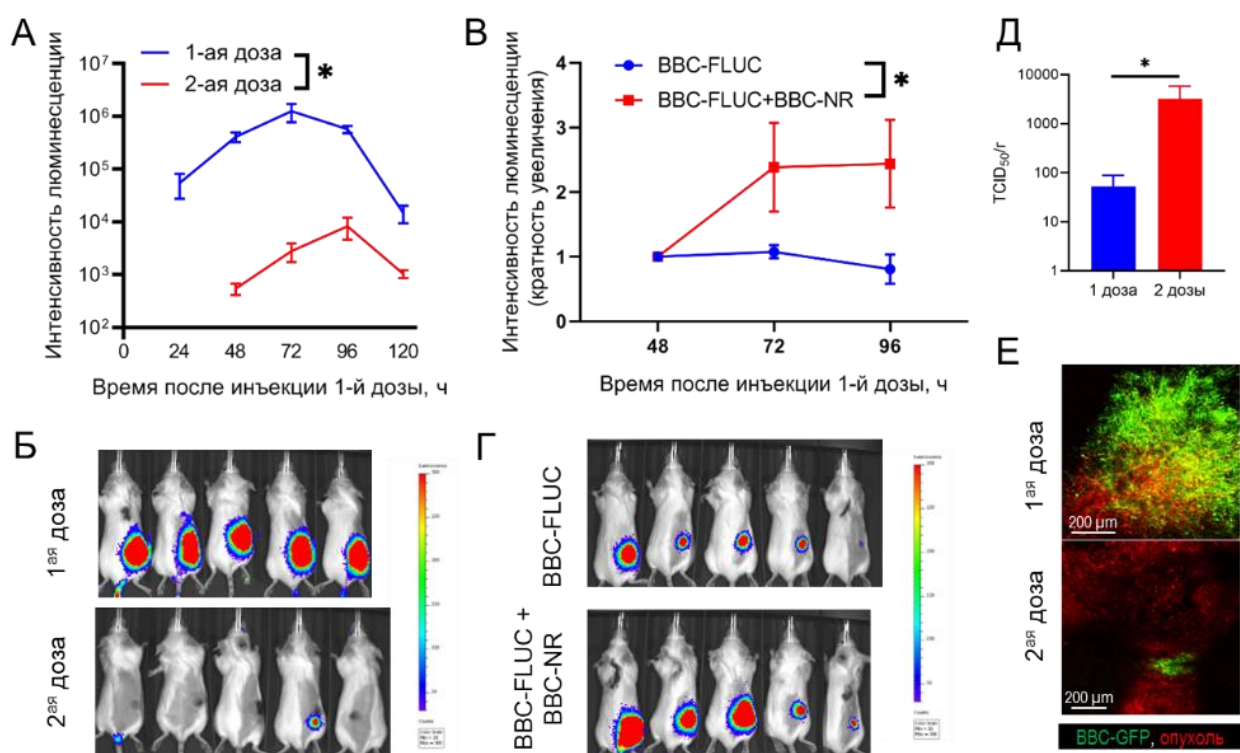


Рисунок 19. Инфицирование опухоли при однократном и двукратном введении ВВС. Количественный анализ (А) и репрезентативные изображения (Б) экспрессии вирусного трансгена в опухоли СТ26 при введении ВВС-FLUC в качестве первой и второй дозы (среднее±SEM; * $p < 0.05$, двусторонний ANOVA). Количественный анализ (В) и репрезентативные изображения (Г) экспрессии вирусного трансгена в опухоли СТ26 при однократном и двукратном введении ВВС-FLUC (среднее±SEM; * $p < 0.01$, двусторонний ANOVA). Д. Оценка инфекционной активности вируса, выделенного из опухолей после однократного или двукратного введения ВВС (среднее±SEM; * $p < 0.01$, тест Манна-Уитни). Е. Репрезентативные ИВМ-изображения очагов инфекции в опухоли СТ26-RFP через 24ч после введения первой или второй дозы ВВС-GFP.

Оценку особенностей взаимодействия первой и второй дозы ВВС с клетками опухолевого микроокружения изучали при помощи ИВМ с использованием флуоресцентно-меченных вирионов. Было показано, что первая доза преимущественно связывается с эндотелиальными клетками и нейтрофилами, в то время как вторая доза вируса захватывается моноцитами (CD11b+/Ly6g-/Ly6c+/F4/80+/CD169+ клетками; Рисунок 20А-В)

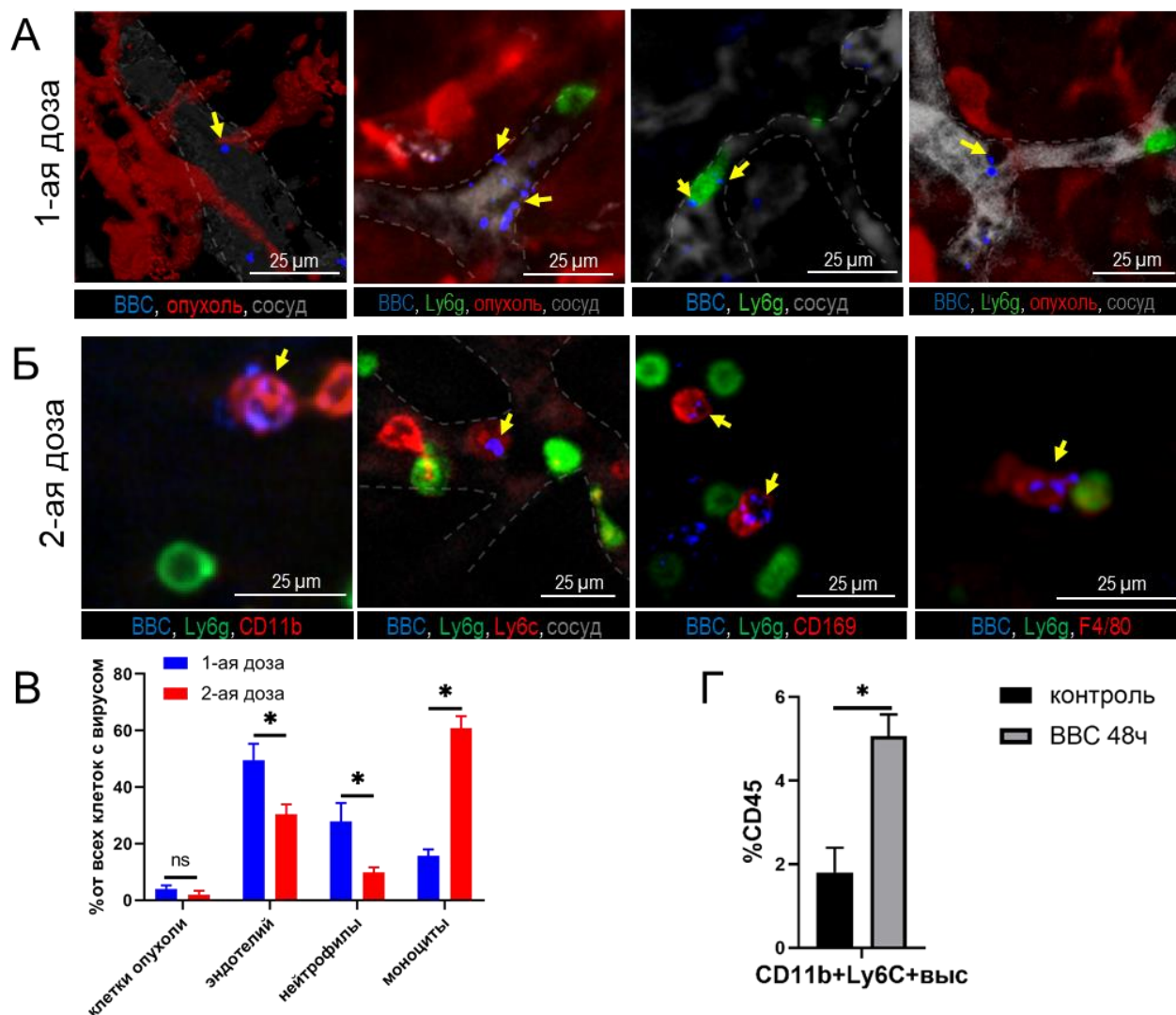


Рисунок 20. Взаимодействие первой и второй дозы ВВС с клетками опухолевого микроокружения. Репрезентативные изображения взаимодействия вирионов с клетками при первом (А) и повторном (Б) введении ВВС. В. Количественный анализ распределения ВВС между клетками опухолевого микроокружения при первом и повторном введении ВВС (среднее±SEM; * $p < 0.01$, тест Сидака). Г. Оценка популяции опухолевых моноцитов при первом и повторном введении ВВС (среднее±SEM; * $p < 0.05$, непарный t-тест).

Следует отметить, что количество моноцитов на момент введения второй дозы было значительно выше, чем при первоначальной инъекции вируса. Эти результаты были подтверждены методом проточной цитометрии (Рисунок 20Г). Увеличение количества моноцитов

через 48ч после введения первой дозы ВВС происходило не только локально (в опухоли), но также системно (в крови и селезенке), в то время как численность других субпопуляций лейкоцитов не изменялась.

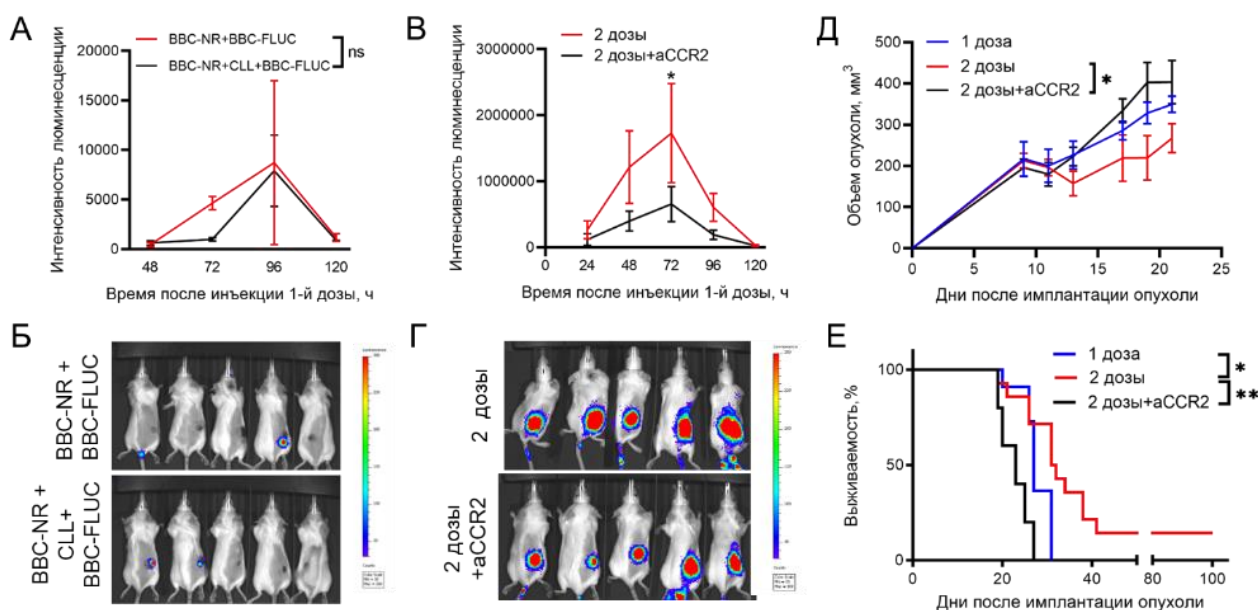


Рисунок 21. Роль моноцитов в распространении инфекции в опухоли при однократном и двухкратном введении ВВС. Количественный анализ (А) и репрезентативные изображения (Б) экспрессии вирусного трансгена в опухоли СТ26 при введении ВВС-FLUC в качестве второй дозы на фоне деплеции моноцитов и без нее (среднее±SEM; двусторонний ANOVA). Количественный анализ (В) и репрезентативные изображения (Г) экспрессии вирусного трансгена в опухоли при двухкратном введении ВВС-FLUC на фоне деплеции моноцитов и без нее (среднее±SEM; * $p < 0.05$, тест Сидака). Динамика роста опухолей СТ26 (Д; среднее±SEM; * $p < 0.001$, тест Сидака) и выживаемость (Е; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, лог-ранк тест) при двухкратном введении ВВС на фоне деплеции моноцитов и без нее.

Чтобы оценить роль моноцитов в реализации противоопухолевой активности первой и второй дозы ВВС, оценивали динамику инфекции в опухоли на фоне деплеции моноцитов, которую осуществляли путем внутривенного введения клондронатных липосом или внутрибрюшинного введения деплецирующих анти-CCR2 антител. В отсутствии моноцитов инфицирующая активность второй дозы вируса не изменялась (Рисунок 21А, Б), однако наблюдалось снижение распространения инфекции, вызванной первой дозой (Рисунок 21В, Г). Более того, деплеция моноцитов полностью нивелировала терапевтические преимущества, которые наблюдались при двухкратном введении вируса по сравнению с однократной инъекцией (Рисунок 21Д, Е). Интересно, что деплеция моноцитов в аналогичной схеме лечения, но без введения второй дозы не оказывала эффекта на распространение инфекции в опухоли. При

использовании другого вируса (Мараба) из семейства Rhabdoviridae описанный эффект от деплеции моноцитов на опухолевую инфекцию в двухкратной схеме лечения воспроизводился.

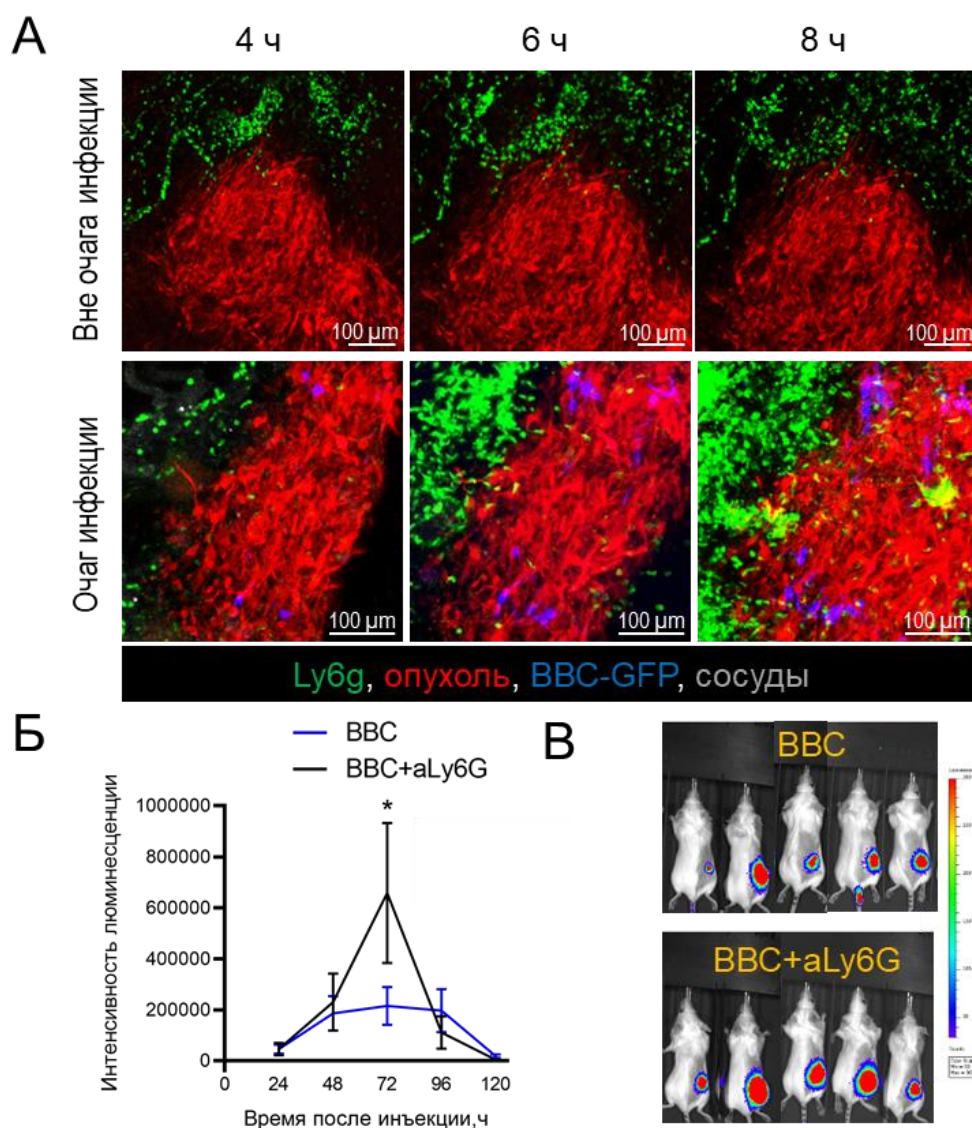


Рисунок 22. Роль нейтрофилов в распространении инфекции BBC в опухоли. А. Репрезентативные ИВМ-изображения нейтрофилов в инфицированном и неинфицированном участке опухоли СТ26-RFP. Количественный анализ (Б) и репрезентативные изображения (В) экспрессии вирусного трансгена в опухоли СТ26 при введении BBC-FLUC на фоне деплеции нейтрофилов и без нее (среднее±SEM; * $p < 0.05$, тест Сидака).

Далее проводили оценку влияния нейтрофилов на распространение вирусной инфекции в опухоли. Методом ИВМ было показано, что нейтрофилы мигрируют в очаги вирусной инфекции (Рисунок 22А). Деплеция нейтрофилов приводила к более выраженному распространению вируса в опухоли (Рисунок 22Б-В) как при однократном, так и двухкратном введении BBC-FLUC. Данные

результаты свидетельствуют о том, что нейтрофилы препятствуют репликации вируса в опухоли СТ26.

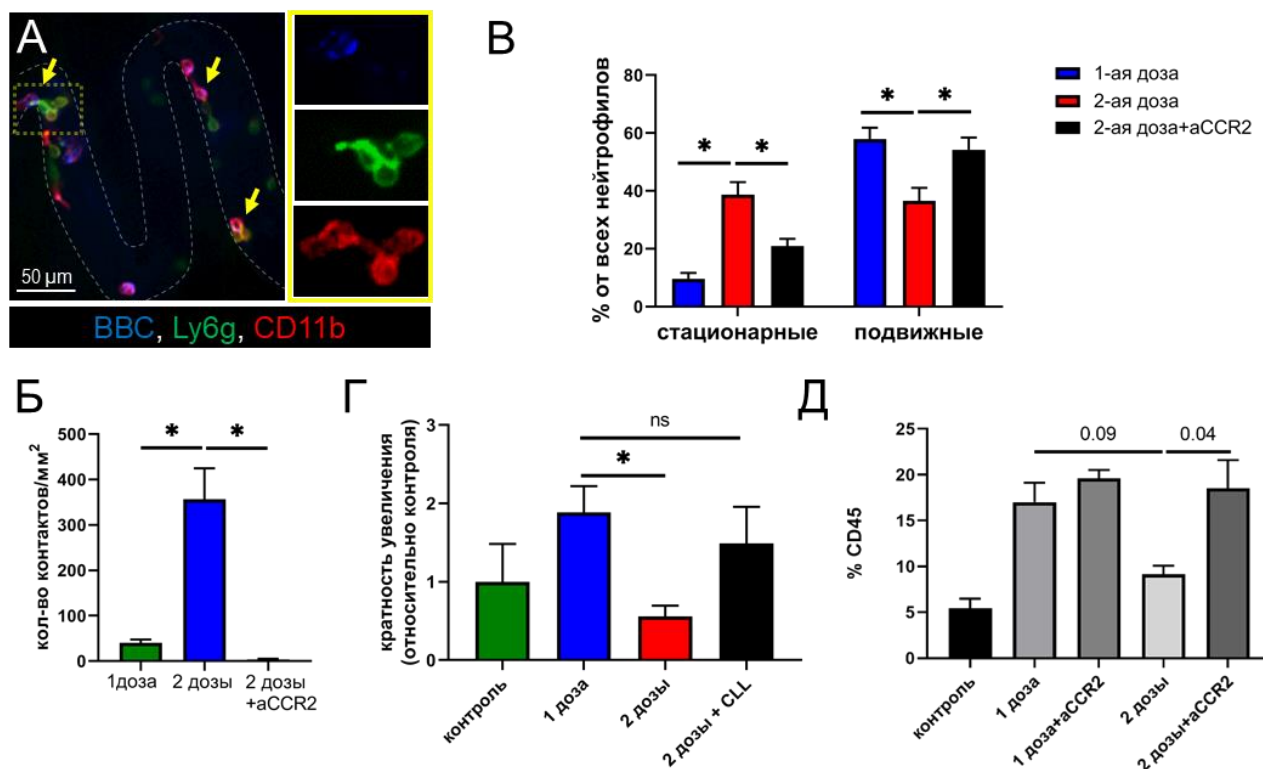


Рисунок 23. Роль моноцитов в подавлении противовирусной активности нейтрофилов при повторном введении ВВС. Репрезентативное ИВМ-изображение (А) и количественный анализ (Б) контактов нейтрофилов с моноцитами, связывающими вторую дозу ВВС (среднее \pm SEM; * p <0.001, тест Тьюки). В. Количественный анализ поведения нейтрофилов в разных схемах терапии (среднее \pm SEM; * p <0.001, тест Сидака). Г. Концентрация нейтрофильного хемоаттрактанта МІР-2 в опухолевом микроокружении в различных схемах терапии (среднее \pm SEM; * p <0.05, тест Сидака). Д. Анализ популяции опухолевых нейтрофилов в различных схемах терапии (среднее \pm SEM; тест Тьюки).

При более детальном изучении событий, происходящих в опухолевом микроокружении, был раскрыт механизм, связывающий терапевтический эффект второй дозы ВВС с функцией моноцитов и нейтрофилов. Оказалось, что моноциты, захватывающие вторую дозу вируса, образуют длительные контакты с нейтрофилами (Рисунок 23А-Б), в результате чего уменьшается способность последних к миграции в очаги инфекции (Рисунок 23В). Кроме того, на фоне локального снижения уровня МІР-2 (одного из важнейших хемокинов, привлекающих нейтрофилы; Рисунок 23Г) уменьшается количество этих клеток в опухолевом микроокружении (Рисунок 23Д). При деплеции моноцитов, а также в отсутствии второй дозы описанные эффекты не наблюдаются.

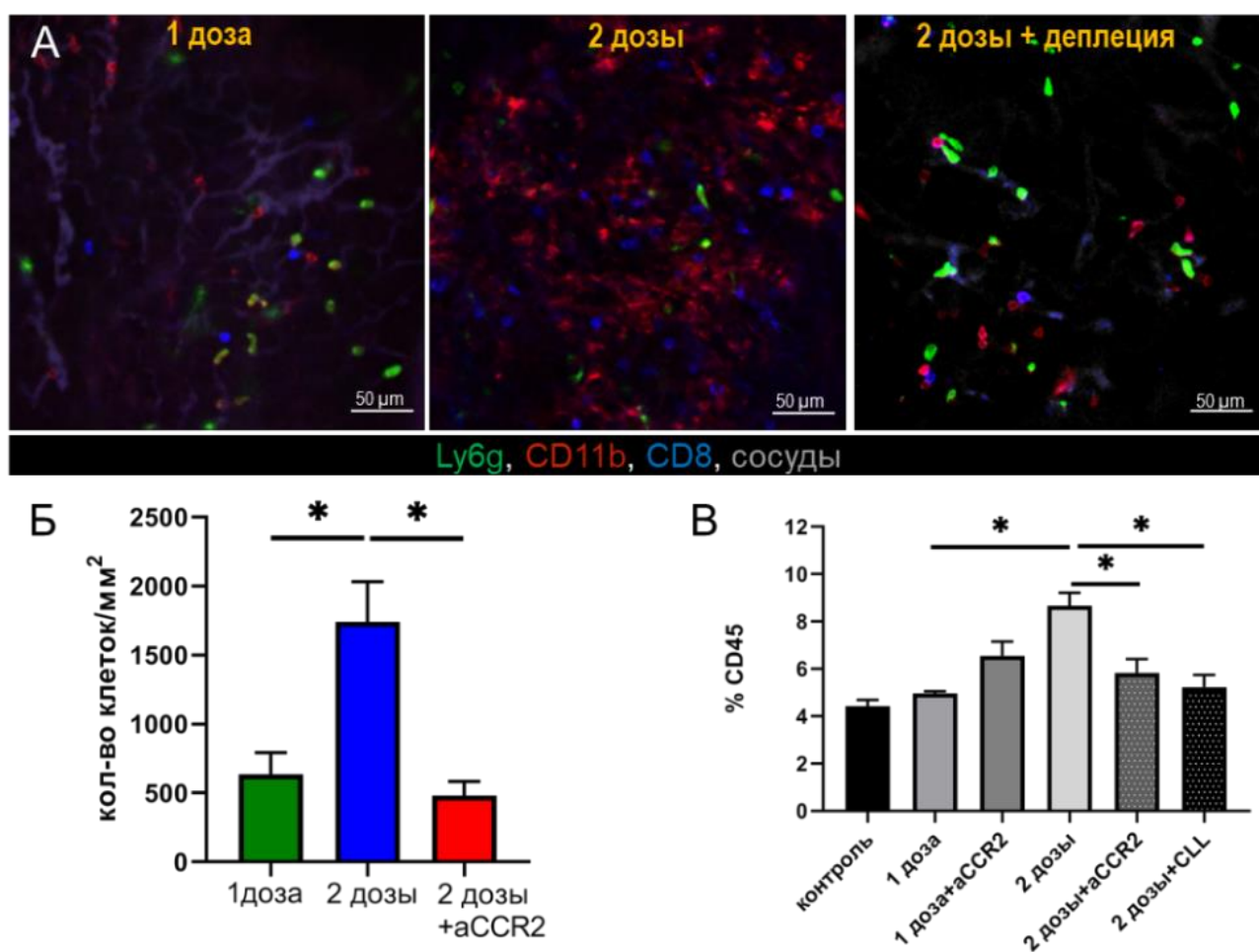


Рисунок 24. Роль моноцитов в активации Т-клеток при повторном введении ВВС. Репрезентативные ИВМ-изображения (А) и количественный анализ (Б) инфильтрации Т-лимфоцитами опухоли СТ26 в различных схемах терапии (среднее±SEM; * $p < 0.001$, тест Тьюки). В. Анализ популяции опухолевых Т-лимфоцитов в различных схемах терапии (среднее±SEM; тест Тьюки).

Наконец, была показана важная роль второй дозы вируса в формировании Т-клеточного ответа. Согласно данным ИВМ и проточной цитометрии, количество CD8⁺ клеток значительно увеличивалось через 24ч после повторного введения ВВС по сравнению с однократной инъекцией вируса (Рисунок 24). Важно отметить, что деплеция моноцитов полностью блокировала этот эффект.

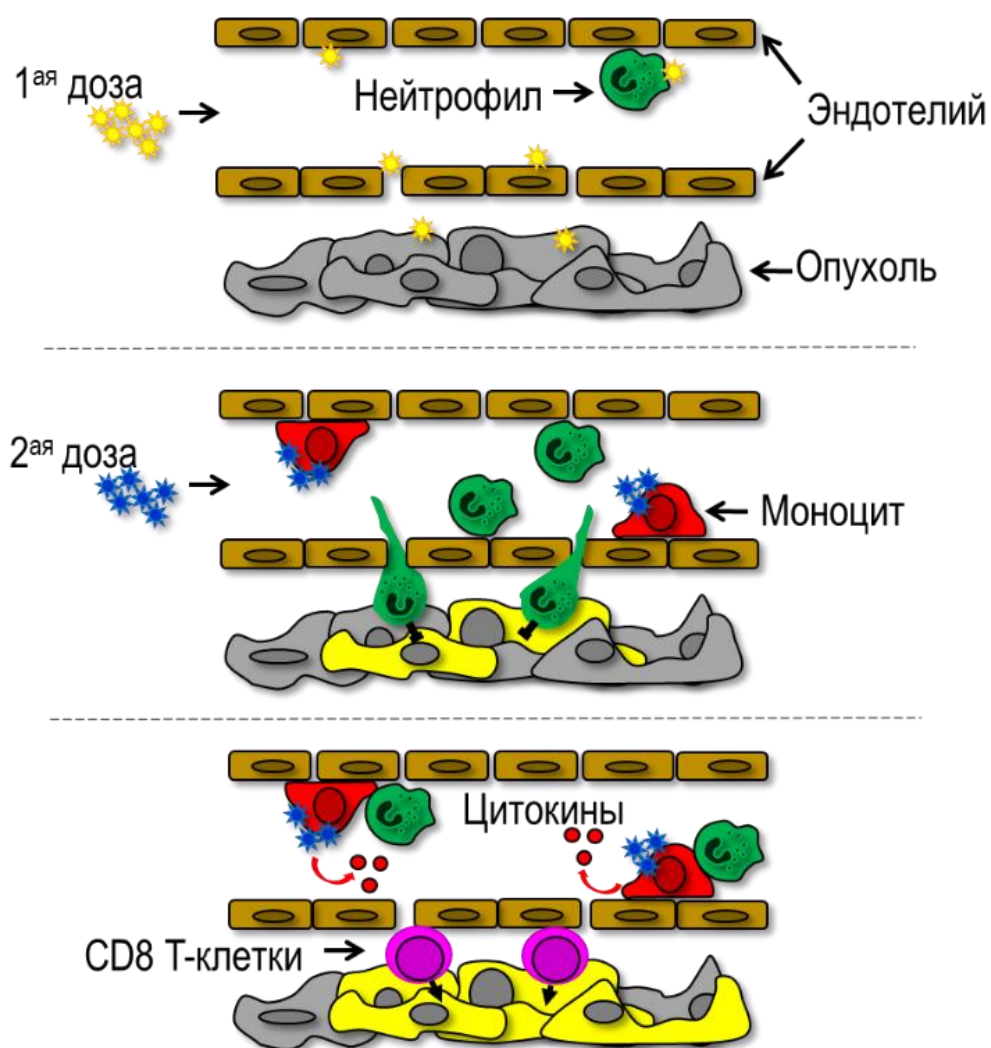


Рисунок 25. Схематическое изображение механизмов противоопухолевой активности первой и второй дозы ВВС.

В совокупности, полученные результаты позволяют реконструировать события, происходящие при повторном введении ВВС (Рисунок 25). После введения первой дозы происходит инфицирование опухолевых клеток и формирование воспалительного ответа, в частности, инфильтрация опухоли нейтрофилами и моноцитами. Первые принимают участие в клиренсе очагов инфекции, вторые – активно захватывают вторую дозу вируса. Результатом взаимодействия моноцитов с вирионами является снижение противовирусной активности нейтрофилов, что позволяет первой дозе более эффективно распространиться в опухоли, а также приводит к стимуляции CD8 T-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые в России метод ИВМ был использован для изучения фармакокинетики и фармакодинамики НЧ, впервые в мире – для исследования механизмов доставки и противоопухолевой активности ОВ. Полученные результаты значительно дополняют существующие на текущий момент представления о взаимодействии нанопрепаратов с клетками опухоли и организма.

При изучении биораспределения нанопрепаратов был выявлен новый механизм почечной фильтрации. Ранее считалось, что НЧ с размером, превышающим 5-6 нм (порог фильтрации гломерулярного фильтра), не могут выводиться с мочой. С помощью ИВМ было показано, что НЧМ с размером 140 нм используют другой путь экскреции: они способны проходить через эндотелий перитубулярных капилляров и далее – через тубулярный эпителий – в просвет канальца. Это открытие меняет представления о механизмах выведения НЧ, а также может быть использовано при создании нанопрепаратов для диагностики и лечения заболеваний почек.

Впервые введена классификация механизмов экстравазации НЧ на основе наблюдения за динамикой их микрораспределения в опухоли. Показано, что из пяти механизмов преодоления сосудистого барьера три связаны с нейтрофилами: 1) транспорт НЧ на поверхности клетки; 2) микроутечка в локусе экстравазации нейтрофила; 3) макроутечка в локусе экстравазации нейтрофила. Последние два механизма были описаны впервые. Кроме того показано, что преимущественный путь доставки в опухоль зависит от типа НЧ, а именно: 1. нейтрофилы способны активно захватывать НЧМ в кровотоке и транспортировать их в опухоль, в то время как липосомы не связываются с нейтрофилами, но способны преодолевать сосудистый барьер вслед за клеткой, выходящей из опухолевого сосуда; 2. пассивный транспорт (спонтанные микро- и макроутечки) более характерен для долгоциркулирующих НЧ, тогда как доставка в опухоль НЧ с коротким временем полувыведения в основном ассоциирована с клеточным транспортом. Более глубокое понимание роли нейтрофилов в доставке НЧ позволит разработать новые клеточные системы доставки противоопухолевых препаратов.

Разделение путей экстравазации липосом на микро- и макроутечки имеет важную клиническую интерпретацию. Во-первых, микроутечки обнаруживаются не только в опухолях, но и в здоровых тканях, что помогает объяснить патогенез кожной токсичности липосомального доксорубина. Во-вторых, хотя микроутечки способствуют накоплению липосом вокруг опухолевых сосудов, они не обеспечивают доступ нанопрепаратов к опухолевым клеткам. Мы предполагаем, что преобладание микроутечек над макроутечками приводит к тому, что

липосомальный доксорубин накапливается в опухолях в большей степени, чем свободный доксорубин, но не приводит к существенному повышению эффективности терапии.

В работе также показано, что после преодоления сосудистого барьера в опухоли НЧ и ОВ связываются в основном с неопухолевыми клетками: НЧМ – с нейтрофилами, НЧ магмемита – с макрофагами, ОВ – с перицитами, липосомы – с макрофагами и перицитами. Данные результаты имеют важные последствия для разработки новых противоопухолевых препаратов, так как открывают возможность специфического воздействия на клетки опухолевого микроокружения, например, М1-поляризации макрофагов или антиангиогенной терапии, опосредованной доставкой терапевтических молекул и генов к перицитам. При этом стоит подчеркнуть, что перицит впервые идентифицирован как основная клетка-мишень для ОВ, что заставляет коренным образом пересмотреть концепцию селективного инфицирования опухолевых клеток при ОВТ.

Наибольший практический интерес представляют исследования особенностей биораспределения нанопрепаратов в клинически используемых схемах терапии, а именно при повторном введении НЧ и ОВ. Впервые доказано, что первая и вторая доза липосом ведут себя идентично, что может стать основой создания сопутствующего МРТ-контрастного диагностикума для предсказания эффективности липосомальных препаратов. В отличие от липосом, первая и вторая доза ОВ обладают принципиально различными механизмами противоопухолевой активности. Так, первая доза ОВ вызывает прямой онколитический эффект и системный воспалительный ответ. Несмотря на то, что вторая доза не инфицирует опухолевые клетки, она способствует распространению инфекции, вызванной первой дозой, и усилению противоопухолевого Т-клеточного ответа, причем эти механизмы опосредованы взаимодействием второй дозы ОВ с моноцитами. Указанные результаты вносят важный вклад в актуальную дискуссию в области ОВТ: нужна ли вторая доза вируса для успешной терапии опухолей или достаточно однократной инъекции? Расшифровка механизмов противоопухолевой активности первой и повторной дозы ОВ позволит усовершенствовать схемы лечения ОВТ.

Полученные результаты наглядно демонстрируют, что разработанная нами методика прижизненного исследования нанопрепаратов в опухоли позволяет получать качественно новую информацию о фармакокинетике и фармакодинамике НЧ и ОВ, необходимую для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

ВЫВОДЫ

1. Крупные наночастицы могут выводиться с мочой, попадая в почечные канальца из перитубулярных капилляров путем трансмиграции через эндотелий и тубулярный эпителий.

2. В-лимфоциты являются основными клетками-мишенями для ВВС в кровотоке, способными адсорбировать вирус и поддерживать его репликацию.
3. Наночастицы магнетита доставляются в опухоль путем пассивных утечек и на мигрирующих нейтрофилах, при этом вклад клеточного транспорта возрастает с уменьшением времени полувыведения НЧ.
4. Липосомы доставляются в опухоль за счет микро- и макроутечек, при этом каждый из указанных путей доставки может быть как спонтанным, так и вызванным экстравазацией нейтрофилов.
5. Основными клетками-мишенями в опухолевом микроокружении для НЧ магнетита являются макрофаги, для онколитических вирусов – пероциты; липосомы накапливаются как в макрофагах, так и в пероцитах.
6. Механизмы доставки и характер микрораспределения первой и повторной доз липосом идентичны, что позволяет предсказывать терапевтическую эффективность липосомального доксорубина путем предварительного анализа накопления МРТ-контрастных липосом.
7. Повторное введение ОВ с интервалом в 48ч не приводит к инфекции опухолевых клеток, но способствует распространению инфекции первой дозы и усилению противоопухолевого Т-клеточного ответа, повышая эффективность терапии.
8. Разработанная методика анализа биораспределения и доставки в опухоль частиц наноразмерного диапазона с помощью ИВМ позволяет решать фундаментальные биомедицинские задачи и оптимизировать схемы противоопухолевой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vishnevskiy D, Garanina A, Chernysheva A, Chekhonin V, Naumenko V. Neutrophil and Nanoparticles Delivery to Tumor: Is It Going to Carry That Weight? *Advanced Healthcare Materials*. 10(9). 2002071. 2021. IF = 7.2 (WoS, Scopus).
2. V. Naumenko, S. Vodopyanov, K. Vlasova, D. Potashnikova, P. Melnikov, D. Vishnevskiy, A. Garanina, M. Valikhov, A. Lipatova, V. Chekhonin, A. Majouga, M. Abakumov. Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy // *J Control Release*. 330 (2021) 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.014>. IF=7.7 (WoS).
3. V. Naumenko; A. Nikitin, A. Garanina, P. Melnikov, S. Vodopyanov, K. Kapitanova; D. Potashnikova, D. Vishnevskiy, I. Alieva, A. Ilyasov, M. Abakumov, V. Chekhonin; A. Majouga. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors // *Acta Biomaterialia*, Volume 104, 1 March 2020, P. 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.011>. IF= 6,6 (WoS).
4. Naumenko VA, Vlasova KY, Garanina AS, Melnikov PA, Potashnikova DM, Vishnevskiy DA, Vodopyanov SS, Chekhonin VP, Abakumov MA, Majouga AG. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors. *ACS Nano*. 2019 Nov 26;13(11):12599-12612. doi: 10.1021/acsnano.9b03848. Epub 2019 Oct 18. IF=13.9 (WoS)
5. Naumenko V, Nikitin A, Kapitanova K, Melnikov P, Vodopyanov S, Garanina A, Valikhov M, Piyasov A, Vishnevskiy D, Markov A, Golyshev S, Zhukov D, Alieva I, Abakumov M, Chekhonin V, Majouga A. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release*. 2019 Aug 10;307:368-378. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.026. Epub 2019 Jun 25. IF=7.9 (WoS)
6. Капитанова К.С., Науменко В.А., Гаранина А.С., Мельников П.А., Абакумов М.А., Алиева И.Б. Перспективы использования наночастиц для репрограммирования опухолевых макрофагов в иммунотерапии злокачественных новообразований. *Биохимия*, 2019, 84 (7): 934-952. IF=1.9 (WoS)
7. Водопьянов С.С., Кунин М.А., Гаранина А.С., Гриненко Н.Ф., Власова К.Ю., Мельников П.А., Чехонин В.П., Сухинич К.К., Макаров А.В., Науменко В.А., Абакумов М.А., Мажуга А.Г. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2019, 1: 3-11. Получение и тестирование клеток, экспрессирующих флюоресцентные белки, для исследования опухолевого микроокружения методом интравитальной микроскопии. IF=0.6 (WoS)
8. Naumenko V, Garanina A, Nikitin A, Vodopyanov S, Vorobyeva N, Tsareva Y, Kunin M, Piyasov A, Semkina A, Chekhonin V, Abakumov M, Majouga A. Biodistribution and Tumors MRI

- Contrast Enhancement of Magnetic Nanocubes, Nanoclusters, and Nanorods in Multiple Mice Models. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018 Sep 24;2018:8264208. doi: 10.1155/2018/8264208. eCollection 2018. IF=2.0 (WoS)
9. Turk M, Naumenko V, Mahoney DJ, Jenne CN. Tracking Cell Recruitment and Behavior within the Tumor Microenvironment Using Advanced Intravital Imaging Approaches. *Cells*. 2018 Jul 3;7(7). pii: E69. doi: 10.3390/cells7070069. IF = 5.6 (WoS)
 10. Efremova MV, Naumenko VA, Spasova M, Garanina AS, Abakumov MA, Blokhina AD, Melnikov PA, Prelovskaya AO, Heidelmann M, Li ZA, Ma Z, Shchetinin IV, Golovin YI, Kireev II, Savchenko AG, Chekhonin VP, Klyachko NL, Farle M, Majouga AG, Wiedwald U. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics. *Sci Rep*. 2018 Jul 26;8(1):11295. doi: 10.1038/s41598-018-29618-w. IF = 4.0 (WoS)
 11. Naumenko V, Van S, Dastidar H, Kim DS, Kim SJ, Zeng Z, Deniset J, Lau A, Zhang C, Macia N, Heyne B, Jenne CN, Mahoney DJ. Visualizing Oncolytic Virus-Host Interactions in Live Mice Using Intravital Microscopy. *Mol Ther Oncolytics*. 2018 Jul 14;10:14-27. doi: 10.1016/j.omto.2018.06.001. eCollection 2018 Sep 28. IF = 5.7 (WoS)
 12. Naumenko V., Turk M., Jenne C.N., Kim S.J. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res*. 2018; 371(3): 505-516. IF=3.4 (WoS)
 13. Науменко В. А., Гаранина А.С., Водопьянов С.С., Никитин А.А., Преловская А.О., Демихов Е.И., Абакумов М.А., Мажуга А.Г., Чехонин В.П. Магнитно-резонансная томография для персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки наноформуляций противоопухолевых препаратов. *Вестник Российского государственного медицинского университета*, 2018, 6: 22-26. IF=0.13 (WoS).
 14. Kim D.S., Dastidar H., Zhang C., Zemp F.J., Lau K., Ernst M., Rakic A., Sikdar S., Rajwani J., Naumenko V., Balce D.R., Ewanchuk B.W., Taylor P., Yates R.M., Jenne C., Gafuik C., Mahoney D.J. Smac mimetics and oncolytic viruses synergize in driving anticancer T-cell responses through complementary mechanisms. *Nat Commun*. 2017; 8(1): 344. IF = 11.9 (WoS)
 15. Naumenko V., Jenne C., Mahoney D. Intravital microscopy for imaging the microenvironment of subcutaneous tumors in mice. In book: *Methods in Molecular biology*, Springer press. 2016; 1458: 217-230. IF = 1 (SCOPUS)

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВВС – вирус везикулярного стоматита

ИВМ – интравитальная микроскопия

МЛ – магнитные липосомы

МРТ – магнитно-резонансная томография

НЧ – наночастицы

НЧМ – наночастицы магнетита

ОВ – онколитические вирусы

ОВТ – онколитическая виротерапия

ФЛ – флуоресцентные липосомы