

ИНТРАВИТАЛЬНАЯ КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОПРЕПАРАТОВ

Е. В. Иванова¹✉, В. А. Науменко², А. С. Гаранина¹, М. А. Абакумов³

¹ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В. П. Сербского, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Разработка эффективных средств борьбы с онкологическими заболеваниями — одна из актуальнейших задач биомедицины. Несмотря на успех противоопухолевых нанопрепаратов, низкая эффективность целевой доставки остается основным лимитирующим фактором для их широкого внедрения в клиническую практику. Опухолевое микроокружение — сложная, многокомпонентная система, динамическое взаимодействие которой с наночастицами требует адекватных методов анализа. Интравитальная микроскопия представляет уникальную возможность для изучения препаратов и клеток организма *in vivo* в режиме реального времени. В обзоре описаны возможности и перспективы использования интравитальной микроскопии в изучении биораспределения и доставки нанопрепаратов к опухолевым клеткам на доклинических моделях на животных.

Ключевые слова: интравитальная конфокальная микроскопия, экспериментальная опухолевая модель, нанопрепараты

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20077).

Вклад авторов: Е. В. Иванова, В. А. Науменко — написание текста, подготовка иллюстраций; А. С. Гаранина, М. А. Абакумов — редактирование текста.

✉ **Для корреспонденции:** Елизавета Викторовна Иванова
Ленинский проспект, д. 4, стр. 1, 119049; Москва, Россия; m1803014@edu.misis.ru

Статья получена: 17.06.2025 **Статья принята к печати:** 29.06.2025 **Опубликована онлайн:** 30.06.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.033

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INTRAVITAL MICROSCOPY FOR ASSESSMENT OF ANTI-TUMOR NANOTHERAPEUTIC DELIVERY

Ivanova EV¹✉, Naumenko VA², Garanina AS¹, Abakumov MA³

¹ National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russia

² Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of effective relief for cancer is one of the most urgent tasks of biomedicine. Despite the success of anti-tumor nanotherapeutics, low targeted delivery effectiveness remains a major limiting factor for widespread introduction of those into clinical practice. Tumor microenvironment is a complex, multicomponent system, the dynamic interaction of which with nanoparticles requires adequate analysis methods. Intravital microscopy presents a unique opportunity for *in vivo* assessment of drugs and body's cells in the real-time mode. The review describes the possibilities and prospects of using intravital microscopy to study the nanotherapeutic biodistribution and delivery to tumor cells in preclinical animal models.

Keywords: intravital microscopy, preclinical tumor model, nanotherapeutics

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 21-74-20077).

Author contribution: Ivanova EV, Naumenko VA — manuscript writing, design of the figures; Garanina AS, Abakumov MA — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elizaveta V. Ivanova
Leninsky Prospekt, 4, str. 1, 119049, Moscow, Russia; m1803014@edu.misis.ru

Received: 17.06.2025 **Accepted:** 29.06.2025 **Published online:** 30.06.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.033

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Успехи и проблемы доставки противоопухолевых нанопрепаратов

Наночастицы (НЧ) находят все более широкое применение в медицине, в том числе в таких областях, как химиотерапия, противомикробная терапия, лучевая терапия, диагностика (магнитно-резонансная терапия, или МРТ), компьютерная томография), регенеративная медицина, гипертермия [1]. В контексте борьбы с онкологическими заболеваниями можно выделить три основных сферы применения НЧ. Во-первых, в клиническую практику вошли наноформуляции химиопрепаратов (Доксил, Келикс, Онивид), использование которых позволяет повысить специфичность доставки лекарств и при этом снизить их накопление в здоровых тканях. Во-вторых, ферумокситол и другие НЧ металлов

успешно применяют для неинвазивного выявления опухолевых очагов методом МРТ. В-третьих, большим потенциалом для тераностики обладают наночастицы с радионуклидными компонентами. В этой области наибольшее распространение получили полимерные НЧ, липосомные носители, дендримеры, НЧ оксида железа, НЧ диоксида кремния, а также углеродные нанотрубки.

Эффективность всех вышеперечисленных способов диагностики и терапии напрямую зависит от степени накопления НЧ в тканях. Очевидно, что в биораспределении препарата чрезвычайно важную роль играет путь его введения. В большинстве экспериментальных исследований, а также в клинической практике НЧ используют в виде внутритропухолевых (интратуморальных, локальных) или внутривенных (системных) инъекций. В первом

случае достигается высокая концентрация препарата в опухолевом очаге и удается значительно снизить его накопление в здоровых тканях. К сожалению, данный путь введения применим лишь в особых клинических ситуациях, а именно при наличии легкодоступного и четко визуализируемого первичного опухолевого очага без метастазирования. Напротив, системное введение теоретически позволяет нанопрепаратам достичь с кровотоком опухоли любой локализации и размера, однако существенным недостатком данной стратегии является низкая эффективность доставки, связанная с наличием нескольких биологических барьеров. Так, на пути к опухолевым клеткам НЧ должны избежать захвата органами ретикулоэндотелиальной системы, выйти из кровотока (экстравазировать) в локусе новообразования и проникнуть к опухолевым клеткам через плотную соединительную ткань. Следует отметить, что, несмотря на указанные сложности, именно системное введение препарата является наиболее перспективным методом борьбы с многообразием новообразований.

На протяжении более 30 лет считалось, что при системном введении специфическое накопление НЧ в опухоли обусловлено так называемым EPR-эффектом (от англ. *enhanced permeability and retention*) — повышенной проницаемостью кровеносных сосудов и сниженным лимфатическим дренажем [2, 3]. Однако в последние годы концепция EPR-эффекта вызывает резкую критику из-за серии неудач нанопрепаратов в клинических испытаниях [4, 5]. Есть мнение, что этот пассивный механизм доставки характерен в большей мере для моделей на животных, но не работает на людях. В связи с этим все большее внимание исследователей привлекает возможность активной доставки НЧ, в том числе с использованием клеточных носителей [6, 7]. Нейтрофилы [8–11], моноциты [12, 13], макрофаги [14] и стволовые клетки [15] были предложены в качестве потенциальных кандидатов для доставки нанопрепаратов к раковым клеткам.

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 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 позволяют говорить об опухолевом микроокружении как одном из отличительных признаков рака [16]. Все большее внимание привлекают новые методы лечения, направленные на неопухолевые клетки опухолевого микроокружения, например, антиангиогенная терапия или иммунотерапия. Однако для повышения эффективности указанных терапевтических подходов необходимо детальное понимание взаимодействий между клетками опухолевого микроокружения и нанопрепаратами.

Выяснение механизмов доставки и противоопухолевой активности НЧ долгое время было непростой задачей из-за отсутствия адекватных методов оценки динамических взаимодействий между нанообъектами и клетками организмами *in situ*. До недавнего времени арсенал доступных методов исследования опухоли был ограничен микроскопией фиксированных образцов и биохимическим анализом — методами, не позволяющими

изучать поведение нанопрепаратов в организме в режиме реального времени. Ситуация качественно изменилась с появлением интравитальной микроскопии (ИВМ), предоставляющей возможность исследовать динамические процессы в живых тканях на клеточном и субклеточном уровне [17, 18]. Данный метод, успешно зарекомендовавший себя в исследовании различных биологических процессов [19–21], может быть использован для изучения механизмов доставки и противоопухолевой активности нанопрепаратов на качественно новом уровне [22].

В России использование ИВМ для исследования биораспределения и доставки НЧ в опухоль было внедрено в процесс доклинического исследования кандидатных противоопухолевых препаратов. В данном обзоре представлены пилотные результаты и перспективы использования метода ИВМ в разработке инновационных методов противоопухолевой терапии.

Интравитальная микроскопия в исследовании путей доставки противоопухолевых нанопрепаратов

Взаимодействие НЧ с клетками иммунной системы может играть как отрицательную, так и положительную роль в эффективности терапии нанопрепаратами. Так, секвестрация НЧ в резидентных макрофагах печени и селезенки снижает эффективность целенаправленной доставки терапевтических средств к опухолям [23, 24]. Напротив, стационарные лейкоциты, захватывающие НЧ в микроокружении опухоли, могут выполнять роль депо препарата, длительный и постепенный выход которого в ткани улучшает противоопухолевый ответ [25]. Наконец, сохранение подвижности лейкоцитами крови при связывании с НЧ позволяет им транспортировать препарат на большие расстояния и преодолевать физиологические барьеры [26], что лежит в основе концепции клеточно-опосредованной доставки. Использование нейтрофилов для транспортировки нанопрепаратов в опухоль было предложено совсем недавно, и, в отличие от пассивного механизма накопления, факторы, которые способствуют или препятствуют активной доставке НЧ, еще недостаточно изучены.

Метод ИВМ позволил нам наблюдать за поведением в опухоли НЧ различного типа. В работе были использованы наночастицы магнетита (НЧМ), ковалентно связанные с цианиновым красителем Cy5, и липосомы, в состав которых был включен липофильный краситель (DiD). Было показано, что НЧМ могут преодолевать сосудистый барьер как путем пассивного транспорта, так и с использованием нейтрофилов в качестве «троянского коня». Последний механизм был впервые зафиксирован в режиме реального времени: НЧ адсорбируются на поверхности нейтрофила, который, выходя за пределы сосуда, переносит их в опухолевую ткань (рис. 1А). Интересно, что транзитная элиминация нейтрофилов из кровотока привела к снижению накопления НЧМ в опухолях. Эти результаты подтверждают участие нейтрофилов в доставке НЧМ к опухолевым клеткам [27].

Механизмы доставки липосом в опухоль существенно отличались от механизмов доставки НЧМ [28]. Чаще всего выявляли локальные утечки в периваскулярную область (микроутечки) (рис. 1Б). 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.

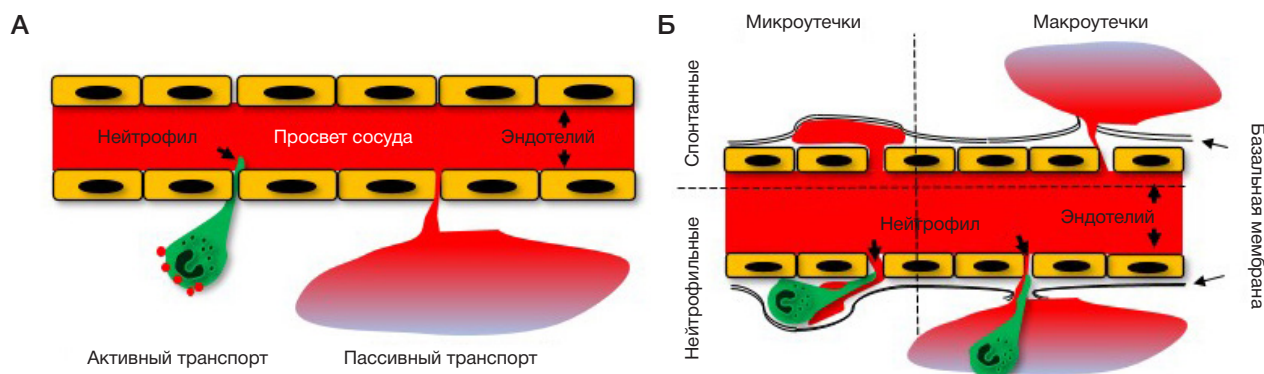


Рис. 1. Роль лейкоцитов в доставке противоопухолевых нанолекарств. **А.** Механизмы экстравазации наночастиц магнетита в микроциркуляторном русле опухолей. **Б.** Механизмы экстравазации липосом в микроциркуляторном русле опухолей

Формирование микроутечек обычно происходило быстро (в течение нескольких минут), и в дальнейшем зона микроутечки практически не изменялась.

Другой, более редкий, тип утечки (рис. 1Б) охватывал обширную область интерстиция, проникая в ткани на глубину нескольких сотен 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. Кроме того, мы наблюдали повторные волны экстравазации липосом 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.

Как и в случае с НЧМ, нейтрофилы также способствовали выходу липосом из сосудистого русла. При изучении динамики формирования микроутечек в режиме реального времени было отмечено, что в некоторых случаях они возникают в локусах экстравазации нейтрофилов. Аналогично, были зафиксированы макроутечки, образующиеся вслед за выходом нейтрофила из сосуда (рис. 1Б).

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 четырех механизмах доставки липосом в опухоль: спонтанно образующихся и нейтрофил-зависимых микро- и макроутечках (рис. 1Б). На фоне деплеции нейтрофилов эффективность накопления липосом в опухоли снижалась на 20–30%, что позволяет дать приблизительную оценку вклада нейтрофилов в доставку липосомных препаратов в опухолевый очаг.

Из-за ограничений разрешающей способности ИВМ не было возможности провести различие между межэндотелиальным и трансэндотелиальным путями экстравазации липосом в опухолевых сосудах [29]. Тем не менее, наблюдение за нейтрофилами и липосомами в опухоли *in vivo* может пролить свет на фундаментальные механизмы транспорта НЧ из просвета сосуда в ткани. Несмотря на очевидные различия, можно предположить, что существует некоторое сходство между экстравазационным

поведением нейтрофилов и липосом. Так, после пересечения слоя эндотелиальных клеток нейтрофилы проявляют стационарное или ползающее поведение в ограниченном субэндотелиальном пространстве [30], и скопление нейтрофилов в периваскулярном компартменте напоминает микроутечку липосом. Затем нейтрофилы проходят через неплотные участки в базальной мембране и высвобождаются из периваскулярного пространства, аналогично прорыву НЧ и диффузии в локусе макроутечки. Примечательно, что некоторые макроутечки развиваются из ранее существовавших микроутечек, и это дополнительно подтверждает идею о том, что два паттерна накопления липосом являются последовательными этапами экстравазации, соответствующими транспорту липосом через эндотелиальный и субэндотелиальный барьеры.

Можно предположить, что описанные паттерны экстравазации играют неравнозначную роль в доставке противоопухолевых препаратов. Во-первых, микроутечки обнаруживаются не только в опухолях, но и в здоровых тканях, что может объяснить кожную токсичность липосомного доксорубина. Во-вторых, хотя микроутечки способствуют накоплению липосом вокруг опухолевых сосудов, они не обеспечивают доступ нанолекарств к опухолевым клеткам. Напротив, макроутечки позволяют липосомам проникать глубоко в опухолевые ткани, способствуя доставке лекарственного средства к клеткам-мишеням. Этот тип экстравазации специфичен для опухолей и различается в зависимости от типа опухоли. Это позволяет предположить, что пассивная доставка липосом к опухолевым клеткам в первую очередь опосредована макроутечками. В-третьих, хорошо известно, что, хотя липосомный доксорубин накапливается в опухолях в большей степени, чем свободный доксорубин, противоопухолевый ответ улучшается лишь незначительно. Недостаточная терапевтическая эффективность может быть отчасти связана с преобладанием микроутечек над макроутечками, что приводит к повышенному накоплению липосом на макроскопическом уровне, но фактически не обеспечивает доступ лекарств к раковым клеткам.

Интравитальная микроскопия в исследовании выведения НЧ почками

Исследование биораспределения — неотъемлемый этап доклинического исследования лекарственных средств. Оно позволяет определить такие важные параметры, как скорость выведения, динамику накопления и преимущественные органы-мишени для препарата.

Согласно современным представлениям, способность НЧ выводиться из организма через почки определяется размером пор гломерулярного фильтра, который составляет примерно 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 НЧМ, размер которых (140 нм) значительно превосходил порог почечной фильтрации [31]. Через 2 ч после внутривенного введения НЧМ отмечалось транзитное повышение уровня железа в почках, сопровождавшееся негативным контрастированием почечной паренхимы на МРТ. Эти неожиданные результаты были подтверждены методом конфокальной микроскопии при использовании флуоресцентно-меченных НЧМ. Кроме того, введение НЧМ сопровождалось повышением содержания железа в моче, а ультраструктурный анализ показал наличие в мочевом осадке интактных НЧ.

Для того чтобы понять причину почечной экскреции НЧ, более чем в 20 раз превышающих порог гломерулярного фильтра, мы проводили ИВМ поверхностного кортекса почки в момент введения НЧМ-Су5. Сразу после инъекции наблюдалось контрастирование частицами перитубулярных капилляров, а уже через 25 мин флуоресцентный сигнал локализовался преимущественно в почечных канальцах. Примечательно, что на ранних этапах после введения препарата накопление происходило не в просвете, а в базальном компартменте тубулярного эпителия, и это свидетельствует о том, что НЧМ не фильтруются через клубочки, а достигают эпителия со стороны тубулоинтерстиция. При дальнейшем наблюдении за судьбой НЧМ-Су5 в почках отмечали транзитное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в просвете почечных канальцев.

Принимая во внимание полученные результаты, можно предположить, что транслокация из крови в мочу через перитубулярные эндотелиальные и почечные эпителиальные клетки является альтернативным путем выведения синтетических НЧ с размером, превышающим порог клубочковой фильтрации (рис. 2). Можно предположить, что это недооцененный механизм, который может объяснить некоторые описанные ранее примеры парадоксальной почечной экскреции крупных НЧ.

На самом деле описание почечного клиренса крупных НЧ в литературе не редкость, и обычно это объясняется деградацией НЧ [32–39]. Вместе с тем, накапливается все больше свидетельств в пользу экскреции с мочой крупных интактных НЧ, которая до сих пор оставалась необъясненной. Так, в недавнем исследовании почечный клиренс был показан для 20 нм пегилированных магнитных НЧ [40]. Данный феномен авторы объяснили потенциальной гибкостью НЧ, которая позволяет им проходить через мембрану гломерулярного фильтра. Другой случай неожиданной фильтрации в почках описан для углеродных нанотрубок [41]. Авторы предположили, что определенная ориентация в потоке наностержней с размерами 200–300 нм и соотношением сторон от 100 : 1 до 500 : 1 обеспечивает возможность их прохождения через поры. Так же как и в наших экспериментах, оба цитируемых исследования описывают пик экскреции через 30–60 мин после введения и накопление НЧ в проксимальных канальцах. Хотя авторы объясняют это реабсорбцией НЧ эпителиальными клетками из просвета канальцев, альтернативная гипотеза

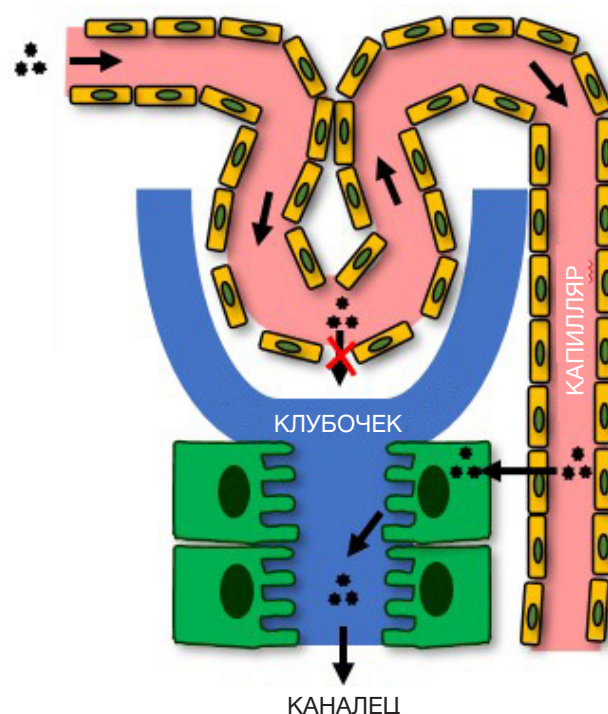


Рис. 2. Механизм почечной экскреции наночастиц с размером выше порога клубочковой фильтрации

заключается в том, что проникновение НЧ в почечный эпителий происходит через перитубулярные капилляры. В одних исследованиях почечную фильтрацию нанолитов из оксида графена (1 × 1000 нм, 5 × 200 нм) объясняли морфологической деформацией частиц (скольжением, сжатием или складыванием) [42, 43], в то время как в другой группе было сделано предположение, что причиной выделения с мочой интактных силикатных НЧ (размер 22 × 185 нм и 65 × 720 нм) является нарушение барьерной функции мембраны гломерулярного фильтра [44].

Для ферумоксита, одобренного FDA препарата НЧ оксида железа, покрытых декстраном (размер 17–30 нм), неожиданно было обнаружено значительное накопление в проксимальных канальцах, в то время как НЧ декстрана размером 13 нм в основном находили в клубочках [45]. Авторы предположили, что это было связано с широким разбросом ферумоксита по диаметру, так что определенная доля НЧ оказалась меньше порогового размера мембраны гломерулярного фильтра. В этом случае можно ожидать, что основная доля НЧ все равно накапливалась бы в клубочках, однако об этом не сообщалось. Хотя локализация ферумоксита в канальцах была аналогична распределению выводимых с мочой НЧ декстрана размером 5 нм, в отличие от последних, накопление ферумоксита не влияло на эндоцитоз альбумина, а также экспрессию мегалина и клатрина в проксимальных канальцах. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что ферумокситол попадает в эпителий с базолатеральной стороны без участия абсорбционных механизмов в канальцах. Хотя нельзя исключить морфологическую деформацию и дисфункцию мембраны гломерулярного фильтра для каждого отдельного типа НЧ, мы предполагаем, что транслокация через эндотелий и эпителий канальцев — более распространенное явление, которое может хотя бы частично объяснить ранее полученные данные о парадоксальной фильтрации.

Описание альтернативного механизма транслокации НЧ в перитубулярных капиллярах является собой смену

парадигмы в бионанотехнологии, поскольку позволяет подразумевать наличие новых критериев для почечного клиренса. Возможно, этот факт будет иметь важные клинические последствия в нефрологии и онкологии.

Перспективы использования интравитальной микроскопии в клинической практике

В клинической практике противоопухолевая терапия нанопрепаратами, как правило, представляет собой серию последовательных системных инъекций. В связи с этим возникает вопрос о том, будет ли поведение второй и последующих доз отличаться от поведения первой дозы. Потенциальное влияние первой дозы НЧ на последующие может быть связано как с системными факторами (изменение степени захвата НЧ клетками ретикулоэндотелиальной системы), так и с модуляцией опухолевого микроокружения.

Для ответа на эти вопросы были исследованы особенности биораспределения повторной дозы липосом методом ИВМ [46]. В качестве первой дозы вводили немеченные липосомы, а через 24 ч — флуоресцентно-меченные. Было показано, что время полувыведения и профили накопления первой и второй доз 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. Для того чтобы напрямую оценить пространственное накопление двух доз в опухоли, проводили эксперименты, в которых первая и вторая дозы липосом были связаны с разными красителями. Через 48 ч / 24 ч после введения первой / второй дозы липосом была показана высокая степень колокализации двух флуоресцентных сигналов.

Отсутствие различий 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 проверки этой гипотезы использовали липосомы, содержащие НЧ магнита размером 5 нм, которые можно детектировать в опухоли методом МРТ; в качестве терапевтического препарата был использован липосомный доксорубин (Келикс). ИВМ показала, что ни загрузка в липосомы магнитно-контрастного диагностикума, ни наличие в них лекарственного препарата не нарушают высокую степень колокализации двух доз липосом в опухоли.

Валидацию алгоритма персонализированной диагностики и терапии опухолей проводили на доклинической модели. Животных, которым ввели внутривенную дозу диагностических липосом, с помощью МРТ распределяли на группы с сильным и слабым накоплением препарата. Далее каждую из групп разделяли на две подгруппы, в которых животные получали либо Келикс, либо свободный доксорубин. Оказалось, что в группе с высоким накоплением диагностических липосом наблюдается более выраженное снижение скорости роста опухолей и увеличение выживаемости по сравнению с животными с низким уровнем накопления диагностикума. Следует отметить, что при лечении свободным доксорубином не было выявлено различий в скорости опухолевой прогрессии между группами с высоким и низким уровнями накопления магнитных липосом.

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

Следует заметить, что метод ИВМ не только позволяет решать фундаментальные медико-биологические задачи, но и имеет потенциал практического применения. Так, в 2016 г. вышла первая работа, показывающая возможность ИВМ опухолей у пациентов [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение метода ИВМ позволяет на качественно новом уровне исследовать биораспределение и механизмы доставки нанопрепаратов к опухолевым клеткам на доклинических моделях на животных. На текущий момент использование ИВМ в клинической практике ограничено в том числе узким спектром флуоресцентных красителей, одобренных к применению на людях. Однако вектор развития современных методов микроскопии направлен на использование спектров аутофлуоресценции клеток для их визуализации в отсутствие каких-либо внешних красителей. Появление коммерчески доступных микроскопов, использующих данный принцип детекции, значительно расширит диагностические возможности ИВМ.

Литература

1. Ahlawat J, et al. Nanoparticles in Biomedical Applications. In: Green Nanoparticles. Springer, Cham, 2020; p. 227–250.
2. Nakamura Y, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? Bioconjug Chem. 2016; 27 (10): 2225–38.
3. Bertrand N, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev. 2014; 66: 2–25.
4. Wilhelm S, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nat Rev Mater. 2016; 1 (5): 16014.
5. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? J Control Release. 2016; 244 (Pt A): 108–21.
6. Mitchell MJ, King MR. Leukocytes as carriers for targeted cancer

- drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12 (3): 375–92.
7. Tiet P, Berlin JM. Exploiting homing abilities of cell carriers: Targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2017; 145: 18–26.
 8. Xue J, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nat Nanotechnol.* 2017; 12 (7): 692–700.
 9. Chu D, et al. Photosensitization Priming of Tumor Microenvironments Improves Delivery of Nanotherapeutics via Neutrophil Infiltration. *Adv Mater.* 2017; 29 (27): 1701021.
 10. Chu D, et al. Nanoparticle Targeting of Neutrophils for Improved Cancer Immunotherapy. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5 (9): 1088–93.
 11. Luo X, et al. Neutrophil-mediated delivery of pixantrone-loaded liposomes decorated with poly(sialic acid)-octadecylamine conjugate for lung cancer treatment. *Drug Deliv.* 2018; 25 (1): 1200–12.
 12. Smith BR, et al. High-resolution, serial intravital microscopic imaging of nanoparticle delivery and targeting in a small animal tumor model. *Nano Today.* 2013; 8 (2): 126–37.
 13. Smith BR, et al. Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nat Nanotechnol.* 2014; 9 (6): 481–7.
 14. Qiang L, et al. A novel macrophage-mediated biomimetic delivery system with NIR-triggered release for prostate cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* BioMed Central. 2019; 17 (1): 83.
 15. Chen K, et al. A TRAIL-Delivered Lipoprotein-Bioinspired Nanovector Engineering Stem Cell-Based Platform for Inhibition of Lung Metastasis of Melanoma. *Theranostics.* 2019; 9 (10): 2984–98.
 16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646–74.
 17. Schießl IM, Castrop H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy // Pflugers Archiv European Journal of Physiology. Springer Verlag. 2016; 468 (9): 1505–16.
 18. Naumenko V, Jenne C, Mahoney DJ. Intravital microscopy for imaging the tumor microenvironment in live mice. *Methods Mol Biol.* 2016; 1458: 217–30.
 19. Li JL, et al. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc.* 2012; 7 (2): 221–34.
 20. Ritsma L, et al. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc.* 2013; 8 (3): 583–94.
 21. Stolp B, Melican K. Microbial pathogenesis revealed by intravital microscopy: pros, cons and cautions. *FEBS Lett.* 2016; 590 (13): 2014–26.
 22. Miller MA, Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 113: 61–86.
 23. Inturi S, et al. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano.* 2015; 9 (11): 10758–68.
 24. Arami H, et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015; 44 (23): 8576–607.
 25. Miller MA, et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat Commun.* 2015; 6: 8692.
 26. Naumenko V, et al. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018; 371 (3): 505–16.
 27. Naumenko V, et al. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors. *Acta Biomater.* 2020; 104: 176–87.
 28. Naumenko VA, et al. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors. *ACS Nano.* 2019; 13 (11).
 29. Moghimi SM, Simberg D. Nanoparticle transport pathways into tumors. *J Nanoparticle Res.* 2018; 20 (6): 169.
 30. Park SA, Hyun Y-M. Neutrophil Extravasation Cascade: What Can We Learn from Two-photon Intravital Imaging? *Immune Netw.* 2016; 16 (6): 317–21.
 31. Naumenko V, et al. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release.* 2019; 307: 368–78.
 32. Yang K, et al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Lett.* 2010; 10 (9): 3318–23.
 33. Yang K, et al. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano.* 2011; 5 (1): 516–22.
 34. Gary-Bobo M, et al. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew Chemie Int Ed.* 2011; 50 (48): 11425–9.
 35. Lu J, et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* NIH Public Access. 2010; 6 (16): 1794–805.
 36. Fischer NO, et al. Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One.* 2014; 9 (3): e93342.
 37. He Q, et al. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small.* 2011; 7 (2): 271–80.
 38. He X, et al. In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal Chem.* 2008; 80 (24): 9597–603.
 39. Fu C, et al. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials.* 2013; 34 (10): 2565–75.
 40. Gómez-Vallejo V, et al. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale.* 2018; 10 (29): 14153–64.
 41. Ruggiero A, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2010; 107 (27): 12369–74.
 42. Jasim DA, et al. Tissue distribution and urinary excretion of intravenously administered chemically functionalized graphene oxide sheets. *Chem Sci.* 2015; 6 (7): 3952–64.
 43. Jasim DA, et al. The Effects of Extensive Glomerular Filtration of Thin Graphene Oxide Sheets on Kidney Physiology. *ACS Nano.* 2016; 10 (12): 10753–67.
 44. Huang X, et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011; 5 (7): 5390–9.
 45. Nair AV, et al. Characterizing the interactions of organic nanoparticles with renal epithelial cells in vivo. *ACS Nano.* 2015; 9 (4): 3641–53.
 46. Naumenko VA, et al. Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy. *J Control Release.* 2021; 330: 244–56.
 47. Fisher DT, et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. *Nat Commun Nature Publishing Group.* 2016; 7 (1): 1–9.

References

1. Ahlawat J, et al. Nanoparticles in Biomedical Applications. In: *Green Nanoparticles.* Springer, Cham, 2020; p. 227–250.
2. Nakamura Y, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem.* 2016; 27 (10): 2225–38.
3. Bertrand N, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 66: 2–25.
4. Wilhelm S, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* 2016; 1 (5): 16014.
5. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release.* 2016; 244 (Pt A): 108–21.
6. Mitchell MJ, King MR. Leukocytes as carriers for targeted cancer drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12 (3): 375–92.
7. Tiet P, Berlin JM. Exploiting homing abilities of cell carriers: Targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2017; 145: 18–26.

8. Xue J, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nat Nanotechnol.* 2017; 12 (7): 692–700.
9. Chu D, et al. Photosensitization Priming of Tumor Microenvironments Improves Delivery of Nanotherapeutics via Neutrophil Infiltration. *Adv Mater.* 2017; 29 (27): 1701021.
10. Chu D, et al. Nanoparticle Targeting of Neutrophils for Improved Cancer Immunotherapy. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5 (9): 1088–93.
11. Luo X, et al. Neutrophil-mediated delivery of pixantrone-loaded liposomes decorated with poly(sialic acid)-octadecylamine conjugate for lung cancer treatment. *Drug Deliv.* 2018; 25 (1): 1200–12.
12. Smith BR, et al. High-resolution, serial intravital microscopic imaging of nanoparticle delivery and targeting in a small animal tumor model. *Nano Today.* 2013; 8 (2): 126–37.
13. Smith BR, et al. Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nat Nanotechnol.* 2014; 9 (6): 481–7.
14. Qiang L, et al. A novel macrophage-mediated biomimetic delivery system with NIR-triggered release for prostate cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* BioMed Central. 2019; 17 (1): 83.
15. Chen K, et al. A TRAIL-Delivered Lipoprotein-Bioinspired Nanovector Engineering Stem Cell-Based Platform for Inhibition of Lung Metastasis of Melanoma. *Theranostics.* 2019; 9 (10): 2984–98.
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646–74.
17. Schiefl IM, Castrop H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* Springer Verlag. 2016; 468 (9): 1505–16.
18. Naumenko V, Jenne C, Mahoney DJ. Intravital microscopy for imaging the tumor microenvironment in live mice. *Methods Mol Biol.* 2016; 1458: 217–30.
19. Li JL, et al. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc.* 2012; 7 (2): 221–34.
20. Ritsma L, et al. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc.* 2013; 8 (3): 583–94.
21. Stolp B, Melican K. Microbial pathogenesis revealed by intravital microscopy: pros, cons and cautions. *FEBS Lett.* 2016; 590 (13): 2014–26.
22. Miller MA, Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 113: 61–86.
23. Inturi S, et al. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano.* 2015; 9 (11): 10758–68.
24. Arami H, et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015; 44 (23): 8576–607.
25. Miller MA, et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat Commun.* 2015; 6: 8692.
26. Naumenko V, et al. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018; 371 (3): 505–16.
27. Naumenko V, et al. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors. *Acta Biomater.* 2020; 104: 176–87.
28. Naumenko VA, et al. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors. *ACS Nano.* 2019; 13 (11).
29. Moghimi SM, Simberg D. Nanoparticle transport pathways into tumors. *J Nanoparticle Res.* 2018; 20 (6): 169.
30. Park SA, Hyun Y-M. Neutrophil Extravasation Cascade: What Can We Learn from Two-photon Intravital Imaging? *Immune Netw.* 2016; 16 (6): 317–21.
31. Naumenko V, et al. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release.* 2019; 307: 368–78.
32. Yang K, et al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Lett.* 2010; 10 (9): 3318–23.
33. Yang K, et al. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano.* 2011; 5 (1): 516–22.
34. Gary-Bobo M, et al. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew Chemie Int Ed.* 2011; 50 (48): 11425–9.
35. Lu J, et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* NIH Public Access. 2010; 6 (16): 1794–805.
36. Fischer NO, et al. Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One.* 2014; 9 (3): e93342.
37. He Q, et al. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small.* 2011; 7 (2): 271–80.
38. He X, et al. In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal Chem.* 2008; 80 (24): 9597–603.
39. Fu C, et al. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials.* 2013; 34 (10): 2565–75.
40. Gómez-Vallejo V, et al. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale.* 2018; 10 (29): 14153–64.
41. Ruggiero A, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2010; 107 (27): 12369–74.
42. Jasim DA, et al. Tissue distribution and urinary excretion of intravenously administered chemically functionalized graphene oxide sheets. *Chem Sci.* 2015; 6 (7): 3952–64.
43. Jasim DA, et al. The Effects of Extensive Glomerular Filtration of Thin Graphene Oxide Sheets on Kidney Physiology. *ACS Nano.* 2016; 10 (12): 10753–67.
44. Huang X, et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011; 5 (7): 5390–9.
45. Nair AV, et al. Characterizing the interactions of organic nanoparticles with renal epithelial cells in vivo. *ACS Nano.* 2015; 9 (4): 3641–53.
46. Naumenko VA, et al. Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy. *J Control Release.* 2021; 330: 244–56.
47. Fisher DT, et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. *Nat Commun Nature Publishing Group.* 2016; 7 (1): 1–9.