

На правах рукописи

ПОСПЕЛОВ АНТОН ДЖОНОВИЧ

**Роль биомеханических и структурных свойств органических матриц
в регуляции пролиферации и фенотипа клеток рака молочной железы**

1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2024

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Научный руководитель: **Балалаева Ирина Владимировна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Свиридов Александр Петрович** доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник Отделения «Институт фотонных технологий» Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники (КККиФ) НИЦ «Курчатовский институт»

Кумейко Вадим Владимирович кандидат биологических наук, доцент, заместитель директора по развитию Школы медицины и наук о жизни ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита диссертации состоится 20 июня 2024 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23. С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2024/1456/diss-Pospelov-1456.pdf>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Черкасова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Внеклеточный матрикс (ВКМ) — это комплексная межклеточная структура, состоящая в основном из большого количества разнообразных белков и протеогликанов. Тип молекул, их соотношение, а также способ трёхмерного взаимного расположения определяют биохимический и биомеханический профиль матрикса [Theocharis et al., 2016]. Химический состав и структура ВКМ варьируют между тканями, что делает каждый орган уникальным с точки зрения взаимодействия клеток с матриксом [Walma et al., 2020]. ВКМ является одним из ключевых элементов как нормального, так и опухолевого клеточного микроокружения. К настоящему времени показано, что, наряду с химическим составом матрикса, его биомеханические характеристики являются важным фактором регуляции роста и развития опухолевых клеток, в том числе их пролиферации [Theocharis et al., 2016], дифференцировки [Bonnans et al., 2014], миграции [Vasudevan et al., 2023], контроля клеточной смерти [Pickup et al., 2014], метастазирования [Kai et al., 2019] и ухода от иммунного надзора [Yuan et al., 2023].

Для адгезии к матриксу, определения его химического состава, жёсткости и трёхмерной пространственной архитектуры клетки используют ряд рецепторов, которые различными способами собирают и передают эту информацию. Главными клеточными рецепторами, определяющими биомеханические свойства матрикса, являются интегрины [Kanchanawong et al., 2010] и дискоидин-доменные рецепторы (DDR) [Leitinger et al., 2014]. Большую роль в интерпретации полученного сигнала с учетом общего контекста микроокружения играет рецептор межклеточного взаимодействия Notch [Zhang et al., 2021]. Под воздействием механических сил комплексы рецепторов с компонентами матрикса подвергаются динамическим изменениям, что активирует внутриклеточные сигнальные каскады, оказывающие влияние на пролиферацию, метаболический профиль, а также на миграцию клетки [Aragona et al., 2013; Moreno-Layseca et al., 2014]. Прямая и непрямая передача механических сигналов через интегрины, DDR и Notch между клетками и окружающей средой, как на клеточном, так и на тканевом уровне, делает эти белки «интегрирующим центром», обеспечивающим поддержание механостаза и ориентации клетки в трёхмерной среде [Zhang et al., 2021].

Исследования влияния биомеханических свойств ВКМ на рост и развитие опухолевых клеток в настоящее время получили активное развитие [Zanotelli et al., 2021; Reuten et al., 2022]. Это связано с тем, что ВКМ является одним из важнейших факторов микроокружения при развитии опухолей. Биомеханические свойства ВКМ, согласно данным литературы, способны существенно влиять на автономность и неограниченный рост опухоли [Fan et al., 2021], резистентность к ингибиторам роста [Fan et al., 2021], уход малигнизированных клеток от апоптоза [Shen et al., 2021], их неограниченный репликативный потенциал [Wei et al., 2021], тканевую инвазию опухоли и метастазирование [Nia et al., 2020]. Необходимо отметить, что вопрос о роли биомеханических свойств матрикса остаётся открытым, поскольку экспериментальные данные зачастую противоречивы и, как правило, получены на экспериментальных моделях, сильно отличающихся от реальной ткани [Liu et al., 2018; Melica et al., 2019].

Перспективной модельной системой для исследования роли свойств матрикса представляются очищенные внеклеточные, или децеллюляризованные, матриксы различных органов животных. Такие матриксы сохраняют химический состав,

трехмерную структуру и биомеханические характеристики нативного матрикса [Choudhury et al., 2020]. Полученный материал может быть использован в качестве биосовместимого каркаса для создания моделей опухолевого роста [Lv et al., 2021; van Tienderen et al., 2023], что имеет важное значение для изучения взаимодействий между клетками и матриксом [Wilcox et al., 2005]. Преимуществами таких моделей являются адекватная передача естественных биомеханических свойств ткани, физиологически корректное взаиморасположение клеток в пространстве, а также большая вовлечённость сигнальных путей типа «клетка-клетка» и «клетка-матрикс» в формировании клеточных кластеров [van Tienderen et al., 2023]. Несмотря на ряд ограничений, таких как трудоемкость получения, сложность стандартизации, а также невозможность применения стандартных методов анализа клеточного роста, эта модель, согласно ряду работ, на сегодняшний день является наиболее информативной при исследовании роли матрикса в регуляции процессов канцерогенеза и развития опухоли [Vukadinovic- Nikolic et al., 2014].

Очевидно, что в сложных условиях микросреды эффект влияния матрикса на опухолевую клетку определяется совокупностью различных факторов, таких как химический состав, плотность расположения волокон, пространственная геометрия, биомеханические свойства. При этом действие отдельных факторов может быть как согласованным, так и разнонаправленным (например, механотаксис и хемотаксис могут активировать сигнальные пути с противоположными эффектами) [SenGupta et al., 2021; Zanutelli et al., 2021]. Развитие методов предупреждения и лечения опухолей требует понимания роли каждого из этих факторов. В связи с этим, изучение особенностей биомеханических свойств ВКМ и их связи с механизмами клеточной пролиферации, трансформации, и миграции в конечном итоге может способствовать пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизнедеятельности как злокачественных, так и нормальных клеток.

Цели и задачи исследования:

Цель исследования — выявление роли биомеханических и структурных свойств бесклеточных органных матриксов в регуляции скорости пролиферации и формировании фенотипа клеток рака молочной железы разных линий. Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Разработка протокола получения внеклеточного матрикса различных органов мыши методом децеллюляризации.
2. Анализ тканеспецифичных структурных и биомеханических свойств полученных бесклеточных матриксов, таких как диаметр волокон, размер пор, общая жесткость трехмерной структуры и локальная жесткость индивидуальных волокон.
3. Оценка морфотипа и скорости роста опухолевых клеток разных линий при репопуляции органных матриксов и анализ их связи со структурными и биомеханическими свойствами матрикса.
4. Анализ возможной связи между экспрессией генов ряда белков, регулирующих взаимодействие клеток с матриксом, эпителиально-мезенхимальный переход и ремоделирование матрикса клетками, со структурными и биомеханическими характеристиками органных матриксов.

Научная новизна. Предложен оригинальный протокол децеллюляризации, универсально применимый к широкому спектру мышечных органов, который

обеспечивает высокую степень очистки матрикса от остатков клеток и сохранение естественной архитектоники ткани.

Показано, что структурные и биомеханические свойства децеллюляризованных матриксов, а именно, размер пор и организация волокон, общая жесткость трехмерной структуры и локальная жесткость индивидуальных волокон, сохраняют тканеспецифичные особенности и уникальны для каждого из органов.

Впервые продемонстрировано, что в децеллюляризованных матриксах нормальных органов относительно высокая жесткость в целом препятствует их заселению клетками рака молочной железы. При этом клетки исходно разного фенотипа чувствительны к различным параметрам: мезенхимальные клетки рака молочной железы MDA-MB-231 обладают большей пролиферативной активностью в матриксах с высокой пористостью и низкой общей жесткостью трехмерной структуры, в то время как эпителиоподобные клетки SKBR-3 лучше растут в среде с низкой локальной жесткостью волокон матрикса.

Показано, что рост опухолевых клеток в матриксах с разными биомеханическими и структурными характеристиками сопровождается тканеспецифичным изменением экспрессии генов белков, ответственных за взаимодействие клеток с матриксом, регуляцию их пролиферации и дифференцировки, а также запуск программы эпителиально-мезенхимального перехода.

Научно-практическая значимость. Получены новые знания о вкладе биомеханических и структурных свойств внеклеточного матрикса в развитие опухолей и фенотип опухолевых клеток, что дополняет и расширяет современные представления о механизмах канцерогенеза, развития и метастазирования опухолей. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при создании практических методов предупреждения развития опухолей, а также для разработки новых противоопухолевых агентов и методов лечения, учитывающих комплексную структуру опухоли.

Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Внеклеточный матрикс различных органов обладает уникальными тканеспецифичными структурными и биомеханическими характеристиками, которые могут быть в значительной степени сохранены при проведении децеллюляризации.

2. Структурные и биомеханические свойства матрикса, такие как размер пор, диаметр волокон, локальная (на уровне индивидуальных волокон) и общая (на уровне трехмерной структуры ткани) жесткость, относятся к факторам, оказывающим существенное влияние на способность опухолевых клеток заселять ткань. Ключевые параметры, определяющие влияние матрикса на опухолевые клетки, могут отличаться в зависимости от их исходного фенотипа.

3. Различия свойств органных матриксов могут приводить к тканеспецифичной экспрессии в опухолевых клетках генов рецепторов класса DDR, сигнализации с участием рецептора Notch и активации программы эпителиально-

мезенхимального перехода при участии транскрипционного фактора Snail.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов. Надёжность используемых методов исследования и воспроизводимость результатов подтверждают достоверность полученных данных. Выводы, основанные на полученных в работе данных, согласуются с описанными в литературе результатами независимых исследований.

Апробация. Основные результаты работы были представлены на международных и российских научных мероприятиях: Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019); Международной Пушкинской школе-конференции молодых учёных «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2020); VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) (Троицк, 2020); Пятой Всероссийской конференции молодых учёных и студентов с международным участием VolgaMedScience (Нижний Новгород, 2020); Всероссийской конференции молодых учёных и студентов «Молекулярные и клеточные основы патологии» (Санкт-Петербург, 2020); XXVI и XXVII Нижегородской сессиях молодых учёных (Нижний Новгород, 2021, 2022); International conference VIB Tumor Heterogeneity, Plasticity and Therapy (virtual edition) (Левен, Бельгия, 2021); International conference Advanced Biomaterials to combat cancer (Ланкастер, Великобритания, 2021); 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Онлайн, 2021); VIII Молодёжной школе-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2022); 8th International Conference on Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets (Родос, Греция, 2022); 12-ой Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2023); VII Съезде биофизиков России (Краснодар, 2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 27 работ, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК.

Структура и объём работы. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объём составляет 150 страниц машинописного текста, иллюстрированного 22 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 418 источников.

Благодарности. Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

(проект № FSWR-2023-0032) и Российского научного фонда (проект № 19-74-20168).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный рассмотрению структуры и функций внеклеточного матрикса; особенностей его биомеханических свойств; белков-рецепторов, участвующих в запуске механотрансдукционных сигнальных путей; участия матрикса в регуляции процессов миграции и дифференцировки клеток; роли матрикса в канцерогенезе и развитии опухолей, а также современных экспериментальных моделей опухолевого роста на основе децеллюляризованных органных матриксов.

В главе 2 перечислены использованные в работе материалы и оборудование, описаны методики исследований.

Лабораторные животные и извлечение органов. Мыши линии BALB/c (самки, возраст 6-8 недель) были получены из SPF вивария ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского (протокол № 15 от 15 февраля 2018 г.). Животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. У каждого животного были взяты печень, почки, яичники, селезенка и легкие.

Децеллюляризация органов мыши. Использовали образцы органов размером 0,3×0,3 см. Образцы инкубировали в децеллюляризирующем растворе на орбитальном шейкере; состав среды и время инкубации варьировали в зависимости от используемой методики. В работе было апробировано 5 методик: (1) с использованием 1% додецилсульфата натрия (SDS) [Guilbert et al., 2006], (2) с использованием тритона X-100 и SDS разных концентраций, (3) с добавлением нуклеаз, (4) с добавлением трипсина и апротинина, (5) с использованием SDS и дезоксихолата натрия (SDC). Методики 2-5 являются оригинальными. Оптимальным признан протокол 5, включающий последовательную обработку тканей 0,5% тритоном X-100 (1 час), 0,5% SDS (1 час), 1% SDC (1 час) и 0,075% SDS (24 часа). Все среды содержали 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

Анализ содержания ДНК в ткани осуществляли с помощью набора ExtractDNA Blood (Евроген). Предварительно матриксы дезагрегировали с применением коллагеназы II типа и трипсина.

Клеточные линии и культивирование клеток. Исследования проведены на культурах клеток линий рака молочной железы человека MDA-MB-231 (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и SKBR3 (коллекция клеточных культур Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия).

Рецеллюляризация матриксов. Децеллюляризованные (ДЦЛ) матриксы насыщали нутриентами и затем заселяли опухолевыми клетками путем инъекции 300 тыс. клеток в 500 мкл питательной среды. Матриксы инкубировали в CO₂ инкубаторе. Через день собирали клетки, вышедшие в среду, и повторно вводили в матриксы. Длительность инкубации составляла 7, 14, 21 или 28 сут.

Гистоморфологический анализ с окраской гематоксилином-эозином был применен для оценки сохранности основных структур в ДЦЛ матриксах, количественной оценки площади пор, количества клеток в рецеллюляризованных матриксах и ядерно-цитоплазматического соотношения (N/C). Количественный анализ площади пор был выполнен в программе ImageJ, версия 1.50i. Для этого

исходное гистологическое изображение матрикса преобразовывали в 8-битное изображение, инвертировали и конвертировали в черно-белое. Площадь отдельных пор рассчитывали автоматически с применением порогового значения для обеспечения визуальной целостности пор и низкого фонового шума (5 образцов каждого типа матрикса, по 10 индивидуальных срезов). Количество клеток подсчитывали с помощью программного обеспечения Labscope, версия 3.4 (10 образцов для каждого варианта матрикса, по 5 полей зрения). Ядерно-цитоплазматическое соотношение измеряли с помощью программы ZenLight, версия 3.0.79.0000 (10 образцов по 5 полей зрения, не менее 30 клеток в поле зрения).

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы тканей лиофилизировали с помощью сублимационной сушки Labconco и покрывали проводящим слоем хрома путем физического осаждения из газовой фазы (Covar с PVD-покрытием, Angstrom of mechanical engineering с контроллером осаждения INFICON SKK-310). Изображения получали с помощью настольного сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus при напряжении 10-15 кВ в режиме обратного рассеяния электронов. Исследование выполнено в Институте молекулярной тераностики Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет). Размеры пор и волокон измеряли вручную с помощью программы ImageJ, версия 1.50i. Для каждого типа матрикса было исследовано 5 независимо полученных образцов, для каждого образца проанализировано 6 полей зрения с измерением 30 пор в каждом поле.

Макроиндентирование. Общую жесткость трехмерной структуры ДЦЛ матриксов измеряли путем макроиндентирования с помощью универсальной микромеханической системы Mach-1™ v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, QC, Канада). Исследование выполнено в Институте молекулярной тераностики Сеченовского университета. Каждый матрикс нарезался на кусочки размером примерно 5×5×5 мм таким образом, чтобы в срез попадали все основные тканеспецифичные структуры. Использовали рубиновый сферический индентор радиусом 1 мм. Перед измерениями к нижней платформе прибора был приклеен кусочек наждачной бумаги, что дополнительно предотвращало боковое смещение образца во время вдавливания. В течение всего измерения образец поддерживали влажным. Образец вдавливали с заданной нагрузкой (0,1–0,2 Н), при этом глубина вдавливания составляла от трети до половины толщины образца. Полученные зависимости нагрузки (F) от глубины вдавливания (δ) были аппроксимированы моделью Герца с поправкой на конечную толщину образца:

$$F = \frac{4}{3} f(\delta) \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{\frac{3}{2}} \sqrt{R},$$

где E — модуль Юнга, ν — коэффициент Пуассона образца (был принят равным 0,5, как для большинства биологических образцов), $f(\delta)$ — функция коррекции толщины. Были проанализированы матриксы каждого из исследуемых органов от 10 различных животных, выполнено 3-5 измерений в разных областях каждого образца.

Наноиндентирование методом атомно-силовой микроскопии было применено для измерения жесткости индивидуальных волокон матриксов. Эксперименты были проведены с использованием атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США) в Отделе современных биоматериалов Сеченовского университета. С использованием ротационного криотома ThermoScientific HM525NX (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) были получены срезы толщиной 20 мкм. Срезы переносили на гистологические предметные стекла и затем отмывали от криосреды. Измерения проводили в режиме

объемного усилия с использованием модифицированных консолей SAA-NPI (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США) с постоянной пружины 0,186 Н/м и радиусом кривизны наконечника 3,5 мкм (полусфера). В режиме измерения Force Volume был получен массив силовых кривых, или карта, по сетке размером от 10×10 до 100×100 мкм, состоящий из 20×20 или 64×64 точек. Индивидуальные кривые силы были получены со скоростью 20 мкм/с, глубина вдавливания составляла менее 1 мкм (<5% толщины образца), для обработки была применена модель Герца. Было получено по 5 срезов для 5 независимых образцов каждого типа матрикса; для каждого среза получили 5-6 силовых карт. Затем значения были усреднены между всеми силовыми кривыми карты и между всеми картами для одного типа матрикса.

Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. В работе проанализирована экспрессия генов субъединицы интегрина β_1 (ITGB1), дискоидин-доменного рецептора DDR1 (DDR1), Notch1 (NOTCH1), матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9), и транскрипционных факторов Snail (SNAIL) и Slug (SLUG), В качестве референсных генов использовали гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GADPH), белка-гомолога Pumilio 1 (PUM1) и бета-актина (ACTB), экспрессия которых по данным литературы при переходе к росту в трехмерной культуре не изменяется. РНК выделяли из замороженных образцов рецеллюляризованных матриксов с помощью реагента ExtractRNA. Синтез кДНК проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) и oligo(dT)15 праймера (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических праймеров (данные приведены в диссертации) и набора qPCRmix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе The Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Результаты анализировали по методике $\Delta\Delta C_t$. Для построения тепловых карт и анализа кластеризации использовали онлайн-программу SRplot.

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism (v. 10.2.1). Использованы методы параметрической статистики (дисперсионный анализ ANOVA, методы множественных сравнений, корреляционный анализ). Нормальность распределения данных проверяли по критерию Колмогорова-Смирнова.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Получение децеллюляризованных матриксов мышечных органов

В качестве доноров тканей для матриксов были выбраны мышцы линии BALB/c. Мышечные модели являются общепризнанным стандартом в экспериментальной онкологии, что делает использование их матриксов более актуальным при сравнении с другими моделями *in vitro* и позволяет сопоставлять полученные данные с результатами исследований на животных-опухоленосителях. Известно несколько протоколов, протестированных на мышечных тканях, однако почти все доступные протоколы адаптированы для децеллюляризации только 1-2 органов [Crapo et al., 2011; Somuncu et al., 2020], что уменьшает выбор объектов для тестирования.

В ходе исследования мы протестировали возможность децеллюляризации различных органов мышечной ткани с использованием одного опубликованного ранее [Guilbert et al., 2006] и четырех предложенных нами оригинальных протоколов химической и химико-ферментативной децеллюляризации. В качестве оптимального был признан протокол на основе неионного детергента тритон X-100,

анионных детергентов додецилсульфата натрия и дезоксихолата натрия. Критериями успеха протокола считали высокий уровень элиминации клеточного компонента и сохранение исходной архитектоники органа. Эффективность предложенного протокола подтверждена высокой макроскопической целостностью ДЦЛ матриц всех исследованных органов, наличием в матрицах органоспецифичных гистологических структур и низким содержанием остаточной ДНК. Во всех исследованных образцах общая концентрация ДНК снизилась более чем на 99% (табл. 1), что свидетельствует об успешной децеллюляризации [Choudhury et al., 2020; Edgar et al., 2020].

Таблица 1.

Содержание ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях

	Общее содержание ДНК		
	Нативная ткань, мкг/г сырого веса ткани	ДЦЛ ткань, мкг/г сырого веса ткани	ДЦЛ ткань, % от нативной
Печень	1032±11	0,63±0,28	0,06
Лёгкое	1955±29	0,90±0,12	0,05
Селезёнка	2337±30	2,12±0,14	0,09
Почка	1286±45	1,03±0,32	0,08
Яичник	1757±63	1,22±0,26	0,07

Структурные и биомеханические свойства бесклеточных органных матриц

Гистоморфологический анализ ДЦЛ матриц

Выбор органов для децеллюляризации (легкие, печень, почки, селезенка и яичники) был обусловлен их принципиально разными структурными и механическими свойствами. Полученные нами по разработанному протоколу матрицы как бескапсульных (рис. 1), так и капсульных органов характеризовались высоким качеством сохранения архитектоники и отсутствием клеток. Все проанализированные органные матрицы представляли собой сложную гетерогенную волокнистую структуру с сохранением основных специфических гистологических структур. Клеточные компоненты при стандартной окраске гематоксилин-эозином обнаружены не были.

Количественный анализ площади пор матриц различных органов по гистологическим изображениям (рис. 2А) показал, что в легких, печени и почках преобладают поры площадью 200–400 мкм², в то время как для селезенки и яичников характерны поры площадью менее 200 мкм². Самая большая средняя площадь пор была обнаружена в легких (20,8 мкм²), тогда как наименьшая – в селезенке (7,2 мкм²). Печень, почки и яичник характеризуются средним размером пор 16,4 мкм², 19,8 мкм² и 9,11 мкм² соответственно.

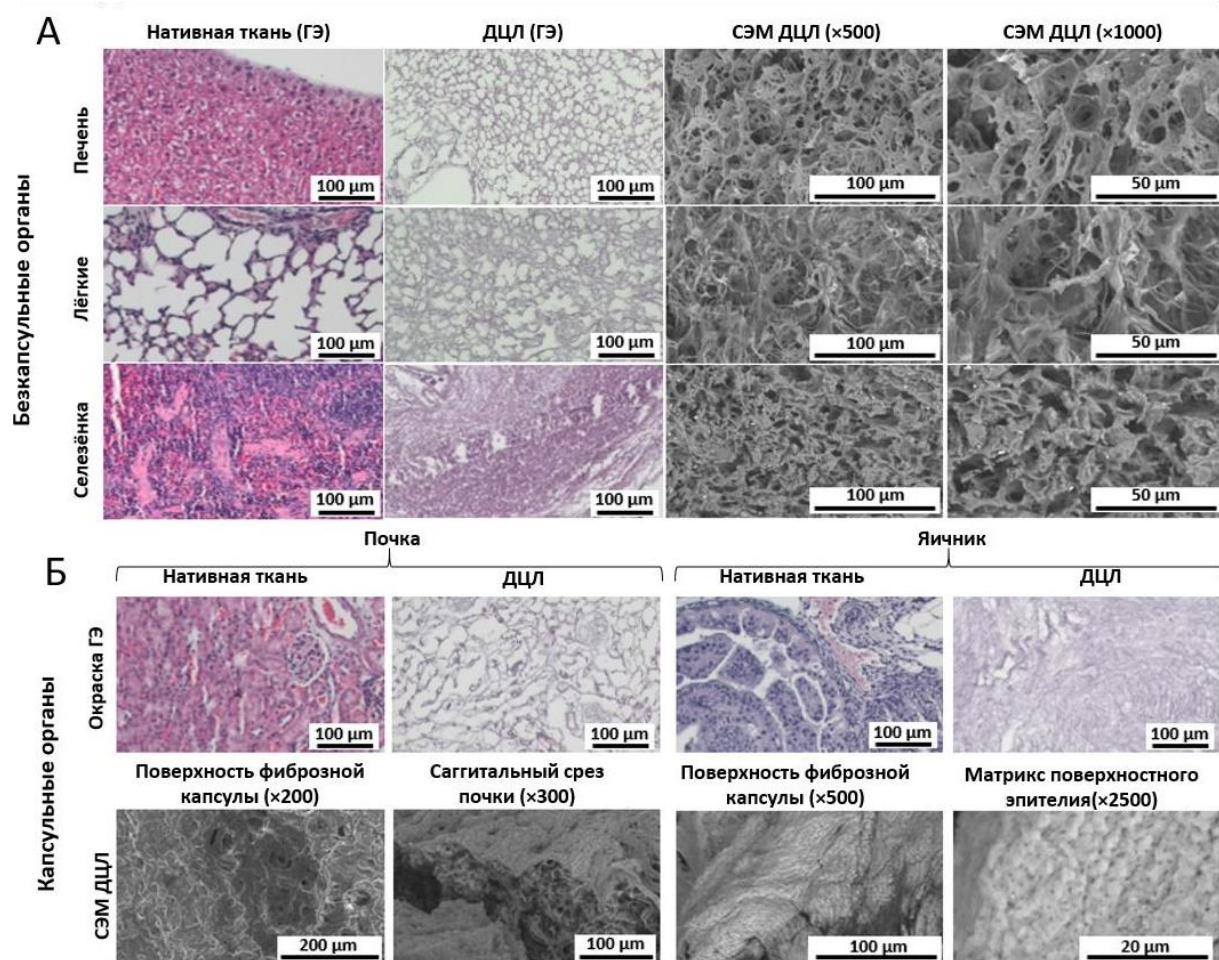


Рисунок 1. Гистоморфологический и СЭМ-анализ децеллюляризованных матриц, полученных из бескапсульных (А) и капсульных (Б) органов. Представлены репрезентативные изображения из серии от 20 до 50 образцов. Для гистологического анализа использовано окрашивание гематоксилином-эозином (ГЭ). Два различных увеличения для СЭМ-изображений приведены на (А) для визуализации степени целостности матрикса и морфологии волокон. Для капсульных органов (Б) были получены СЭМ-изображения для различных частей органа для демонстрации вариабельности структуры

Анализ микроструктуры ДЦЛ матриц методом сканирующей электронной микроскопии

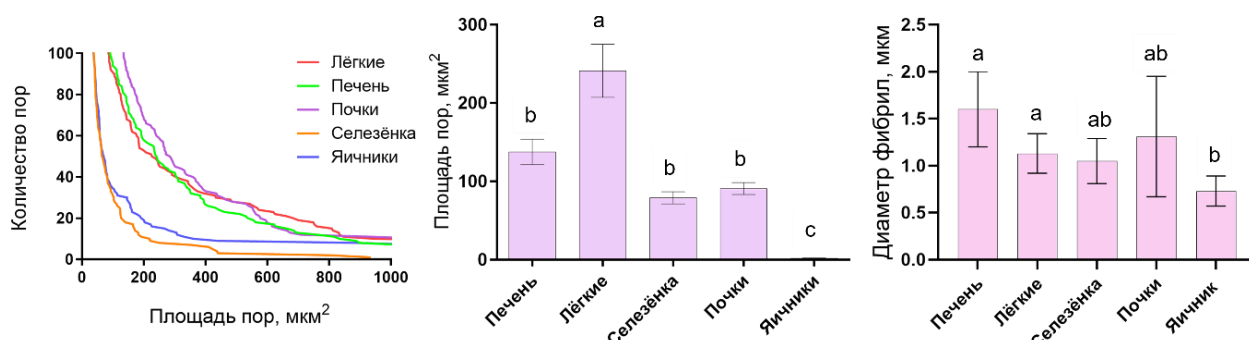
Анализ микроструктуры методом СЭМ подтвердил высокую степень очистки всех матриц от клеточного компонента. При этом показаны тканеспецифические особенности структуры в отношении размера пор, а также ориентации и толщины волокон (рис. 1, 2).

Матрикс печени представлял собой относительно однородный трехмерный волокнистый каркас со средним диаметром волокна $\sim 1,6$ мкм и площадью пор ~ 133 мкм². Площадь пор в матриксе легкого была значительно больше (~ 240 мкм²), при диаметре волокон $\sim 1,13$ мкм. Матрикс селезенки, напротив, имел более плотную структуру и обладал наибольшей компактизацией волокон, а площадь пор составила ~ 78 мкм².

Почка и яичник окружены соединительнотканной капсулой, что привело к необходимости анализа капсулы и паренхимы этих органов по отдельности. Фиброзная капсула почки представляла собой плотную структуру с равномерно распределенными порами, толщина капсулы составляла ~ 10 мкм. Паренхима почки представляла собой высокопористую сеть коллагеновых волокон толщиной около

1,31 мкм с площадью пор ~ 90 мкм². Поверхность соединительнотканной капсулы яичника была рельефной, а при большем увеличении был виден матрикс поверхностного эпителия с толщиной фибрилл $\sim 0,73$ мкм и площадью пор $\sim 1,5$ мкм².

Рис. 2. Микроструктурные характеристики децеллюляризованных матриксов. (А) Гистологический анализ (Б) СЭМ анализ (В) СЭМ анализ



Распределение площади пор для матриксов различных органов по результатам анализа гистологических изображений ($n = 20-50$). (Б) Среднее значение площади пор в матриксах различных органов, рассчитанная по СЭМ-изображениям ($n = 20-50$). (В) Диаметр фибрилл в матриксах различных органов, измеренный с помощью СЭМ ($n = 20-50$). a, b, c – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Важно отметить, что оба использованных подхода, анализ гистологических и СЭМ изображений, показали сопоставимые результаты при оценке размера пор. Таким образом, ДЦЛ матриксы разных органов мыши различаются по размеру пор, а также толщине волокон, что делает каждый орган уникальным с точки зрения возможностей взаимодействия клетки и матрикса.

Общая жёсткость трёхмерной структуры ДЦЛ матриксов

Для определения макромасштабных биомеханических свойств ДЦЛ матриксов был применён метод макроиндентации, который позволяет оценить свойства тканей и органов с учетом их совокупных свойств, включая наличие плотной капсулы, индивидуальные свойства и трёхмерное расположение волокон, плотность волокон, пористость ткани. Изначально в биомеханике этот метод использовался для определения жесткости костной ткани, в настоящее время он адаптирован для измерения как жестких, так и мягких тканей [Levental et al., 2010; Boughton et al., 2018]. В литературе представлены данные по измерению ДЦЛ матриксов различными методами [Sim et al., 2017; Rahman et al., 2018; Guimaraes et al., 2020], однако использованный нами метод не применялся.

В ходе исследования было показано снижение модуля Юнга в серии селезенка > почки > печень > яичники > легкие с измеренными значениями около 40 кПа, 22 кПа, 20 кПа, 19 кПа и 17 кПа соответственно (рис. 3А). Этот результат может быть объяснен различными структурными особенностями, такими как фибриллярная капсула в случае яичника и почки или параллельная упаковка волокон в случае селезенки (рис. 1А, Б). В связи с отсутствием опубликованной информации о результатах измерения жесткости матрикса с помощью этого метода, мы сравнили наши результаты с данными, опубликованными для нативных тканей. Было установлено, что измеренные значения жесткости матриксов хорошо согласуются со значениями жесткости интактных органов человека: селезенка ~ 20 кПа, почка ~ 10 кПа, легкое ~ 12 кПа, печень ~ 9 кПа [Luque et al., 2013].

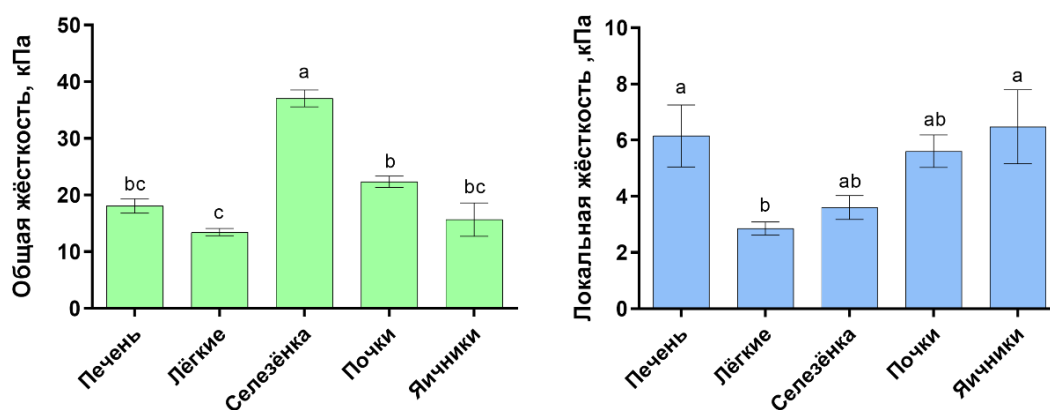


Рисунок 3. Жёсткостные характеристики децеллюляризованных матриц, измеренные методом макроиндентирования (А) и наноиндентирования (Б). а, b, с – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Локальная жесткость волокон ДЦЛ матриц

Рецепция компонентов матрикса клетками обусловлена взаимодействием клеточных рецепторов с индивидуальными волокнами матрикса. В связи с этим мы предположили, что именно особенности волокон могут оказаться важным фактором, определяющим поведение клеток. Механические свойства матриц на уровне индивидуальных волокон были измерены путем наноиндентирования методом атомно-силовой микроскопии. Этот метод широко используется для исследования мягких биологических образцов. Ранее опубликованные результаты сообщают о значениях жесткости ВКМ, полученных при использовании этого подхода, в диапазоне от 2 до 150 кПа [Song et al., 2021; Mayorca-Guiliani et al., 2021].

Нами был показан относительно большой разброс значений между разными органами (рис. 3Б). Волокна матриц легкого и селезенки были одними из самых мягких (2,9 кПа и 3,6 кПа соответственно), в то время как волокна матрикса яичников и печени имели самые высокие значения модуля Юнга (6,5 кПа и 6,1 кПа). Значения модуля Юнга для волокон матриц почки были промежуточными, 5,6 кПа. Высокая вариативность значений жесткости волокон ВКМ в разных тканях также отмечалась в других исследованиях [Jorba et al., 2017; Luque et al., 2013] и может отражать особенности химизма и супрамолекулярной организации волокон.

Стоит отметить существенные отличия в значениях жесткости, полученных при макро- и наноиндентировании. В связи с тем, что архитектура природных тканей достаточно комплексна, жесткость биологической ткани не может быть определена исходя из жесткости её отдельных компонентов. Жесткость внеклеточного матрикса, как и ткани в целом, является результатом комбинированного влияния химического состава, степени сшивания волокон, плотности их укладки, а также трёхмерного геометрического взаиморасположения.

Рост клеток рака молочной железы при репопуляции органных матриц с разными структурными и биомеханическими свойствами

Нами была проведена репопуляция полученных органных матриц клетками двух линий аденокарциномы молочной железы человека, MDA-MB-231 и SKBR-3. Выбор этих линий клеток был обусловлен различием в их степени дифференцировки и инвазивном потенциале. Линия MDA-MB-231 относится к трижды негативному типу рака молочной железы, характеризующемуся чрезвычайно низкой степенью дифференцировки, мезенхимальным фенотипом, высоким инвазивным потенциалом

и высокой пролиферативной активностью [Amaro et al., 2016]. Линия SKBR-3, в свою очередь, представляет собой HER2 положительный высокодифференцированный рак, морфологически мало отличающийся от плоского эпителия, с низкой скоростью роста и низким инвазивным потенциалом [Fahad et al., 2019]. Рецеллюляризованные матриксы анализировали по следующим параметрам: количество клеток, особенности заселения разных структур матрикса, морфотип клеток, пролиферативная активность и ядерно-цитоплазматическое соотношение (рис. 4).

При рецеллюляризации матрикса печени клетки обеих линий формировали кластеры в паренхиме органа. В случае клеток MDA-MB-231 репопуляция была относительно низкой, пролиферативная активность выражена слабо. Клетки линии SKBR-3 были обнаружены в единичном количестве.

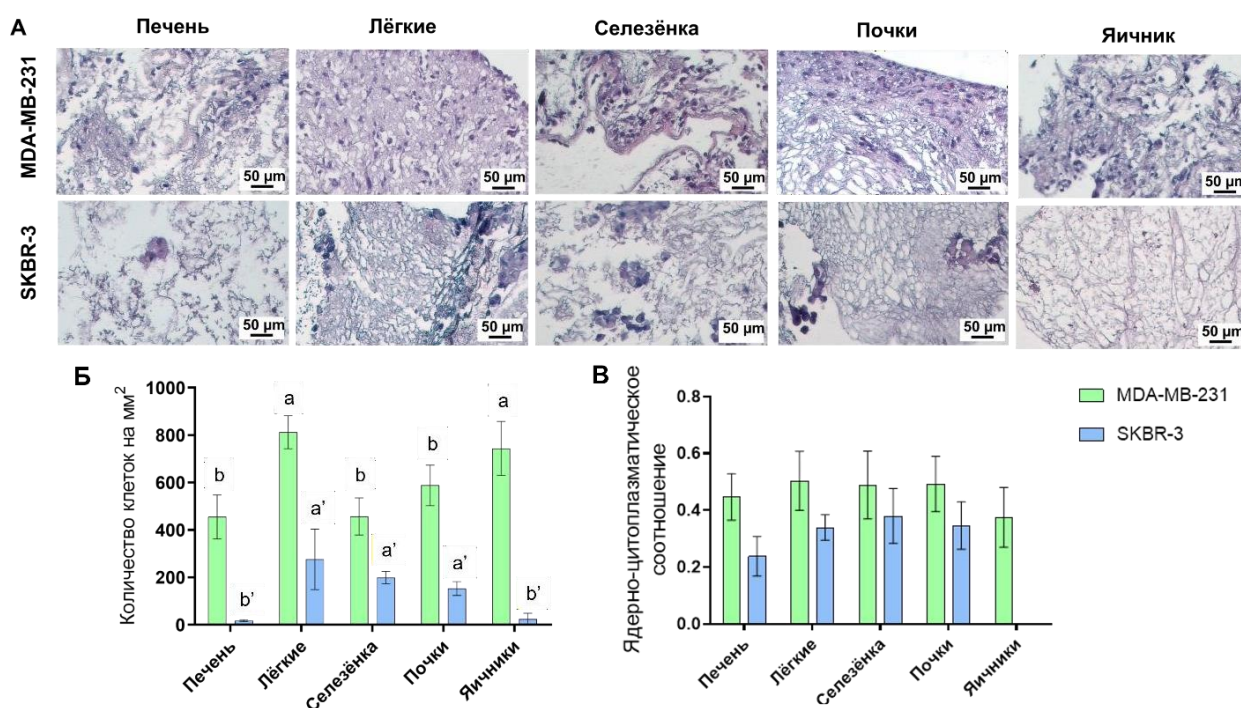


Рисунок 4. Гистоморфологический анализ рецеллюляризованных матриксов (А). Для гистологического анализа использовали окрашивание гематоксилин-эозином. Количественная оценка заселённости матриксов приведена на (Б). Ядерно-цитоплазматическое соотношение приведено в (В). a, b – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Репопуляция матрикса лёгкого клетками MDA-MB-231 была существенно более выражена. Клетки были обнаружены по всему пространству матрикса, прикрепляясь к различным структурам и образуя вытянутые тяжи. Напротив, клетки линии SKBR-3 образовывали большие скопления, похожие на карциноиды, с неправильной полигональной формой отдельных клеток.

После заселения матрикса селезенки клетками MDA-MB-231 они были обнаружены по внутреннему периметру капсулы с единичной локальной миграцией в центральную часть органа. Клетки образовывали рыхлые скопления, а пролиферативная активность была низкой. При заселении клетками SKBR-3 в матриксах были обнаружены разбросанные по паренхиме множественные скопления с неправильной полигональной формой отдельных клеток.

Репопуляция матрикса почки клетками MDA-MB-231 была средней степени

выраженности. Клетки образовали плотный слой под поверхностью капсулы с длинными нитями, уходящими в кортикальное вещество. В случае клеток SKBR-3 можно было отметить образование псевдоэпителиальных скоплений с низкой пролиферативной активностью, расположенных в кортикальном веществе.

После рецеллюляризации матрикса яичников клетки линии MDA-MB-231 были рассеяны по всей толщине органа, морфологически умеренно мезенхимальные. В случае клеток SKBR-3 были обнаружены только ядра и остатки апоптотических телец, что указывает на очень низкую эффективность заселения матрикса для этой линии.

Каких-либо достоверных изменений в соотношении N/C для клеток одной и той же линии, культивируемых в разных матриксах, обнаружено не было.

Анализ связи между структурными и биомеханическими свойствами матрикса и особенностями роста клеток

Проведённый нами анализ позволяет утверждать, что эффективность заселения клетками матриксов сильно зависит от клеточной линии и, предположительно, от фенотипа клеток. В то же время следует отметить, что влияние свойств матрикса на рост клеток наблюдается не только между клеточными линиями, но и внутри каждой из линий. Чтобы определить, какая из характеристик матрикса может оказывать наибольшее влияние на рост клеток, были объединены данные по структурным и биомеханическим параметрам матриксов, а также по морфологии и степени репопуляции матриксов клетками MDA-MB-231 и SKBR-3 (таблица 2) и проведен корреляционный анализ (рис. 5).

Таблица 3.

Основные характеристики децеллюляризованных тканей и клеточных популяций в различных матриксах

		Печень	Лёгкие	Селезёнка	Почки	Яичник
Плотность матриксных волокон		Средняя	Низкая	Высокая	Средняя	Высокая
Площадь пор*, мкм ²		133±15	240±32	78±7	90±7	1,8±0,1
Диаметр фибрилл, мкм		1,6±0,1	1,1±0,2	1,0±0,2	1,3±0,2	0,7±0,2
Локальная жёсткость матрикса (наноиндентация), кПа		6,15±1,1	2,8±0,2	3,6±0,4	5,6±0,5	6,4±1,3
Общая жёсткость матрикса (макроиндентация), кПа		18±1,2	13±0,6	37±1,5	25,4±1	15,7±2,9
Степень репопуляции	MDA-MB-231	Средняя	Высокая	Средняя	Средняя	Высокая
	SKBR-3	Единичные клетки	Низкая	Низкая	Низкая	Единичные клетки
Клеточная морфология	MDA-MB-231	Мез./Эп.**	Мез.	Мез.	Мез.	Мез.
	SKBR-3	Эп.	Эп.	Эп.	Эп.	Эп.

* По данным гистоморфологического анализа

** Мез. – мезенхимальная клеточная морфология, Эп. – эпителиальная клеточная морфология

Была выявлена сильная отрицательная корреляция ($r = -0,97$, $p < 0,05$) между общей жесткостью матрикса и степенью репопуляции клетками MDA-MB-231 (рис.

5). Также была показана выраженная положительная тенденция связи ($r = 0,84$, $p < 0,1$) между площадью пор и репопуляцией матриц этими клетками. В то же время степень репопуляции клетками SKBR-3 достоверно коррелирует ($r = -0,94$, $p < 0,05$) с локальной жесткостью волокон. Связи между заселением клетками MDA-MB-231 и локальной жесткостью, или между заселением клетками SKBR-3 и общей жесткостью матрикса или размером его пор обнаружено не было. Также ни для одной из линий не было показано связи между заселением матриц клетками и диаметром волокон.

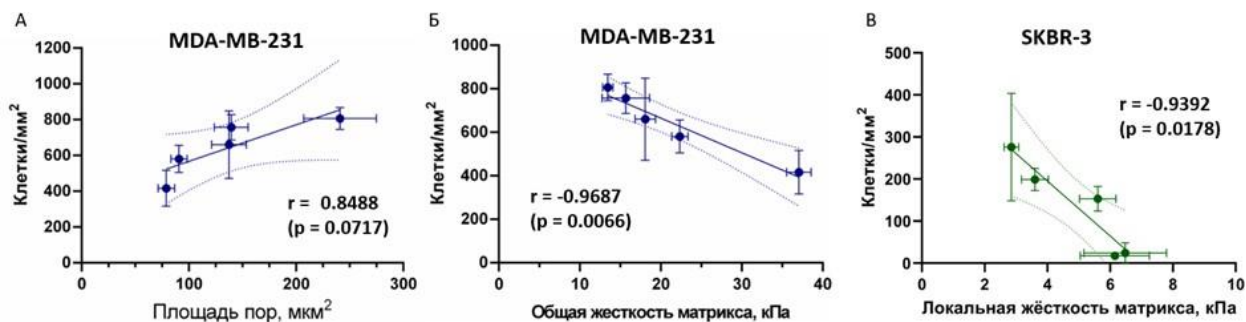


Рисунок 5. Анализ корреляции между свойствами матрикса и ростом клеток аденокарциномы молочной железы ($n = 20-30$). (А) Зависимость количества клеток MDA-MB-231 от площади пор матрикса. (Б) Зависимость количества клеток MDA-MB-231 от общей жёсткости матрикса. (С) Зависимость количества клеток SKBR-3 от локальной жёсткости матрикса. Пунктирные линии указывают на 95%-й доверительный интервал для тренда линейной регрессии. Для всех сравнений указаны коэффициент корреляции Пирсона (r) с уровнем значимости (p)

Таким образом, можно утверждать, что структурно-механические параметры матрикса действительно оказывают влияние на рост клеток рака молочной железы. В зависимости от особенностей фенотипа и пролиферативной активности клеток определяющее влияние, по-видимому, могут оказывать разные индивидуальные параметры. Можно предположить, что в случае клеток с мезенхимальным фенотипом архитектура матрикса органа, отражающаяся в значениях общей жесткости, и размер пор более важны для успешной пролиферации, чем тонкие ультраструктурные особенности волокон, в то время как в случае клеток с более эпителиальным фенотипом, из-за ограниченной способности клеток к миграции, наблюдаются противоположные приоритеты.

Зависящее от жесткости поведение как нормальных, так и опухолевых клеток было ранее широко изучено на двумерных моделях опухолевого роста [Liu et al., 2018; Melica et al., 2019; Pandamooz et al., 2020]. Особенности роста клеток были проанализированы для различных двумерных субстратов как природного, так и синтетического происхождения, в том числе на основе коллагена, фибронектина, полиакриламида и их производных [Li et al., 2020]. Согласно опубликованным данным, в двумерной модели роста увеличение жесткости приводит как правило к более высокой скорости роста и более мезенхимальной морфологии опухолевых клеток, за редкими зарегистрированными исключениями [Peng et al., 2019; Watson et al., 2021]. Однако при переходе к трёхмерным моделям зависимость поведения клеток от жёсткости субстрата становится не такой очевидной. Например, при использовании многокомпонентного геля, изготовленного из коллагена и полиакриламида, было показано, что клетки более чем десяти разных клеточных линий рака молочной железы демонстрируют более высокую скорость роста и более выраженную мезенхимальную морфологию в мягких гелях (0,5–8 кПа) по

сравнению с 2D моделями [Wang et al., 2021; Watson et al., 2021]. Аналогичные закономерности прослеживаются и при работе с моделями на основе ДЦЛ матриц. В частности, при использовании опухолевого матрикса увеличение жесткости не влияло на скорость роста и морфологию клеточной линии MDA-MB-231 [Melica et al., 2019]. Напротив, в случае роста клеток в костном матриксе высокая жесткость способствовала как увеличению скорости роста, так и увеличению мезенхимальной морфологии клеточной линии MDA-MB-231, аналогично результатам, полученным в 2D-моделях [Shah et al., 2023]. Также было показано, что клетки линии MDA-MB-231 лучше растут в старом, более жестком матриксе молочной железы, чем в более молодом и мягком [Lv et al., 2021]. Несмотря на кажущееся противоречие, эти результаты согласуются с нашими: самые высокие значения жесткости матрикса молочной железы достигают около 2 кПа, что близко к жесткости матрикса легкого, полученной в нашем исследовании. Таким образом, оба результата свидетельствуют о существовании оптимального диапазона жесткости для роста опухолевых клеток. В целом, отсутствие четкой закономерности в полученных к настоящему времени результатах подтверждает точку зрения, согласно которой поведение клеток в трехмерном микроокружении не может быть экстраполировано из простых двумерных моделей вследствие существенного влияния дополнительных факторов.

Особенности фенотипа клеток рака молочной железы при росте в органных матриксах

Мы предположили, что изменение пролиферативного и инвазивного потенциала может быть связано с проявлением фенотипической пластичности опухолевых клеток с участием различных транскрипционных программ, запускаемых клеточными рецепторами компонентов матрикса. Для проверки данного предположения был проведен сравнительный анализ экспрессии ряда генов в клетках, выращенных в монослойной культуре и в матриксах разных органов. Для исследования были выбраны следующие гены:

- гены основных рецепторов, отвечающих за взаимодействие клетки с матриксом, — ITGB1 (субъединица интегрин $\beta 1$) и DDR1 (дискоидин-доменный рецептор 1);
- ген NOTCH1, кодирующий одноименный рецептор — один из основных участников передачи механических сигналов, регулирующий важнейшие биологические процессы, такие как пролиферация, дифференцировка, поддержание гомеостаза;
- ген MMP9, кодирующий основной фермент, отвечающий за ремоделирование матрикса клетками — матриксную металлопротеиназу 9;
- гены транскрипционных факторов Snail и Slug — важных регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).

Было показано, что через 7 сут культивирования клеток MDA-MB-231 в ДЦЛ матриксах разных органов уровень экспрессии генов DDR1, SNAIL и NOTCH1 по сравнению с монослойной культурой достоверно увеличивался (рис. 6). Уровень экспрессии генов ITGB1, SLUG и MMP9 при этом достоверно не изменялся.

Наибольшие изменения были зарегистрированы для гена DDR1. Этот тип рецепторов коллагена играет ключевую роль в коммуникации клеток с их микроокружением и участвует в регуляции клеточного роста, дифференцировки и метаболизма. В матриксах печени, лёгкого и почки увеличение экспрессии по

сравнению с монослоем составляло около 10 раз, в матриксе селезенки — около 15 раз, в матриксе яичника экспрессия DDR1 в 20 раз превышала таковую в клетках монослойной культуры. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными результатами, в частности, с работой [Le et al., 2020], в которой показано увеличение уровня экспрессии DDR1 при культивировании клеток колоректального рака в трёхмерном коллагеновом матриксе.

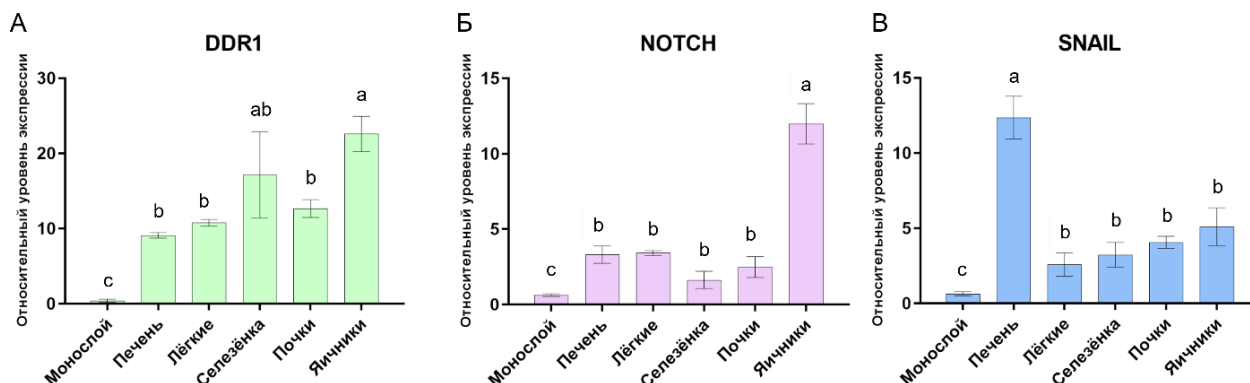


Рисунок 6. Относительный уровень экспрессии генов DDR1 (А), NOTCH1 (Б) и SNAIL (В) у клеток линии MDA-MB-231 в монослойной культуре и через 7 суток культивирования в матриксах разных органов. а, b, с – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Стоит отметить, что уровень экспрессии гена ITGB1, кодирующего одну из субъединиц другого рецептора коллагена — интегрина, не изменялся. Это может быть обусловлено особенностями используемой линии клеток, поскольку ранее было показано, что при переходе к 3D-условиям культивирования уровень экспрессии интегрина в клетках MDA-MB-231 либо не меняется, либо снижается [Kenny et al., 2007].

Уровень экспрессии гена NOTCH1 при культивировании в матриксах всех органов также достоверно увеличивался по сравнению с монослойной культурой. Данный рецептор обеспечивает взаимную активацию сходных признаков в организованных группах клеток, а также регулирует степень их дифференцировки и имеет возможность контролировать активацию и переключение таких важных сигнальных путей как Snail и Slug [Greenwald et al., 2012]. Было показано, что в матриксах большинства органов (печень, лёгкие, селезёнка и почки), уровень экспрессии вырастает в 3–5 раз, а в матриксе яичников — в 13 раз. Аналогичное увеличение экспрессии NOTCH1 при переходе от 2D к 3D культивированию было показано для клеток широкого спектра опухолевых линий [Marconi et al., 2021].

Согласно многочисленным исследованиям, внеклеточный матрикс является одним из ключевых факторов, индуцирующих ЭМП [Hannah et al., 2011; Pickup et al., 2014]. Нами было обнаружено достоверное увеличение экспрессии транскрипционного фактора Snail в матриксах всех органов (в 3–5 раз в матриксах лёгких, селезёнки, почек и яичников, и в 12 раз — в матриксе печени) при отсутствии увеличения экспрессии фактора Slug. Оба данных фактора отвечают за запуск программы эпителиально-мезенхимального перехода и являются его маркерами. Полученные результаты согласуются с современными общими представлениями о роли данных факторов в ЭМП: согласно данным литературы Slug принимает участие в ЭМП преимущественно в ходе регенеративных процессов, в то время как Snail является ключевым фактором ЭМП при злокачественной трансформации [Lambertini et al., 2010; Haslehurst et al., 2012].

Взаимодействие клеток с матриксом — динамический процесс, и одной недели культивации может быть недостаточно для формирования полноценного ответа на изменившиеся условия среды. В связи с этим мы проанализировали особенности роста и фенотипа клеток MDA-MB-231 в течение 28 сут.

Через 7 сут культивирования клетки, по-видимому, адаптировались к условиям матрикса, их количество в большинстве случаев увеличивалось, клетки начинали формировать кластеры. Через 14 сут культивирования мы наблюдали резкое увеличение количества клеток, причём этот рост отличался для матриксов разных органов. Ещё через неделю (21 сут культивирования) было зарегистрировано значительное изменение структуры матрикса, а именно его разрыхление и частичное разрушение. Через 28 сут инкубации матриксы всех органов представляли собой гетерогенную структуру с низким уровнем сохранности основных гистологических структур. Деградация матрикса сопровождалась гибелью части клеток.

Было сделано предположение, что рост клеток в матриксе может сопровождаться переключением транскрипционных программ в связи с модификацией микроокружения в течение времени. В связи с этим мы проанализировали динамику экспрессии указанных выше генов на протяжении 28 сут и её возможную взаимосвязь с характеристиками ДЦЛ матриксов (рис. 7).

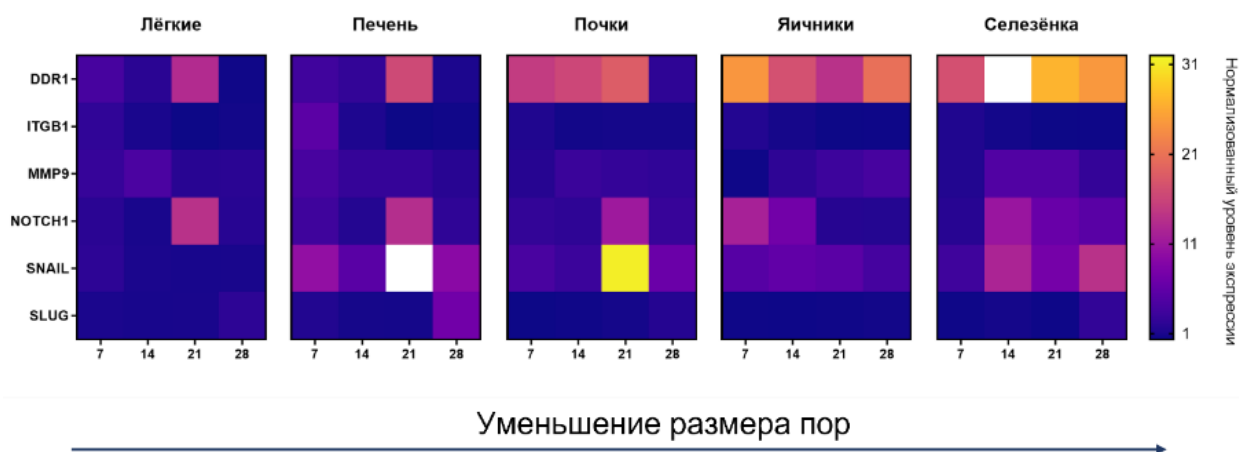


Рисунок 7. Тепловые карты динамики относительной экспрессии генов в клетках MDA-MB-231, культивируемых в матриксах разных органов на протяжении 28 сут. 7, 14, 21, 28 – количество суток роста клеток в матриксе. Уровень экспрессии в монослое принят за единицу

Наиболее выраженная зависимость была показана для такого структурного параметра матрикса, как размер пор. В матриксах с наибольшим размером пор выраженная статистически значимая активация экспрессии DDR1 наблюдалась только на 21 сут. При уменьшении размера пор ген DDR1 активировался во всё более ранние сроки культивирования, а уровень экспрессии существенно возрастал. В матриксах с наименьшими порами экспрессия DDR1 многократно возрастала уже в первую неделю и превышала 30 раз по сравнению с монослойной культурой. В случае с геном Notch можно также отметить сдвиг начала экспрессии и удлинение её периода с 21 сут у клеток в матриксах лёгких, печени и почек, до 17 и даже 7 сут культивирования у клеток в матриксах селезёнки и яичника, что, скорее всего, также связано с уменьшением размера пор. При уменьшении размера пор активация экспрессии SNAIL начинается с первой недели, при достижении максимума на третью. Также нами были отмечены динамические тканеспецифические изменения паттернов экспрессии MMP9, однако значимой корреляции между ними и

структурными или биомеханическими параметрами матрикса обнаружено не было.

Согласно данным литературы, работа всех генов, для которых мы зарегистрировали изменение экспрессии (DDR1, NOTCH1, SNAIL), взаимосвязана и координируется в рамках единого ответа при взаимодействии клетки с матриксом. Мы предполагаем, что уменьшение размера пор сопровождается усилением вынужденного взаимодействия клеток с коллагеновыми волокнами матрикса, что приводит к активации рецепторных комплексов с участием дискоидиновых рецепторов [Van Tam et al., 2012; Fattet et al., 2020; Liang et al., 2020]. Этот процесс, в свою очередь, повышает напряжение сдвига для мембранных рецепторов [Rodriguez et al., 2023], что содействует солокализации мембранного домена Notch с его лигандами и инициирует внутриклеточный сигнальный путь Notch [Safaei et al., 2017], который активирует свою генетическую мишень – Snail [Rodriguez et al., 2023]. DDR1, в свою очередь, препятствует деградации Snail [Velez et al., 2019], что приводит к его накоплению и запуску Snail-зависимых транскрипционных программ [Haslehurst et al., 2012]. Поддержание необходимого количества белков-участников данных сигнальных путей обеспечивается положительной петлей обратной связи с активацией транскрипции соответствующих генов. Согласно данным литературы, одним из следствий активации Snail является взаимодействие опухолевых клеток с опухоль-ассоциированными фибробластами и последующая активация ремоделирования матрикса [Hua et al., 2023; Coelho et al., 2019; Zhang et al., 2016]. Это приводит к увеличению жёсткости матриксных волокон в опухолевой ткани, их укорочению и увеличению диаметра, что в совокупности приводит к уменьшению размера пор, и таким образом закрывает петлю обратной связи. Таким образом опухолевые клетки оказываются в состоянии постоянного физического стресса, механизмы которого обеспечивают каскадное усиление мезенхимального фенотипа [Stanisavljevic et al., 2015; Lv et al., 2017].

Таким образом, было показано, что рост клеток в матриксах действительно сопровождается динамическим изменением экспрессии генов рецепторов, ответственных за механотрансдукционные пути, а также транскрипционных факторов, регулирующих миграционную активность клеток и их способность ремоделировать матрикс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время развивается точка зрения, согласно которой канцерогенез и развитие опухоли в значительной степени обусловлены микроокружением, специфичным для каждой ткани. Опухоли представляют собой сложные образования, состоящие из гетерогенных популяций опухолевых клеток и различных типов стромальных клеток, продуцирующих растворимые факторы, сигнальные молекулы и компоненты внеклеточного матрикса, которые в совокупности могут регулировать рост и прогрессирование опухоли и влиять на ответ на лечение [Egeblad et al., 2010; Safaei et al., 2023]. Одним из важнейших участников клеточного микроокружения является внеклеточный матрикс. Во время прогрессирования большинства опухолей ремоделирование матрикса приводит к изменению его структурных и биомеханических свойств, что оказывает влияние на поведение клеток посредством механосенсорных путей [Dupont et al., 2011].

В рамках проведенного исследования нами был предложен универсальный протокол получения децеллюляризованных органных матриксов, что позволяет создавать модели опухолевого роста, с высокой степенью релевантности

воспроизводящие структурные особенности и биомеханические свойства нативного внеклеточного матрикса. Показана применимость разработанного протокола к широкому спектру мышечных органов с различной структурой тканей, включая, но не ограничиваясь ими, печень, легкие, селезенку, почки и яичники. Наши измерения модуля Юнга полученных ДЦЛ матриксов методом наноиндентирования показывают, что для исследованных органов жёсткость на уровне волокон находится в диапазоне 2,9–6,5 кПа. Полученные результаты согласуются с работой Jorba et al., где сообщается об аналогичном модуле Юнга для нативной (1,96 кПа) и децеллюляризованной (1,6 кПа) легочной ткани крыс [Jorba et al., 2017]. Также мы оценили общую жесткость полученных ДЦЛ матриксов методом макроиндентирования, основываясь на измерениях деформации при сжатии. Полученные данные указывают на то, что абсолютные значения модуля Юнга, измеренные с помощью этого подхода, варьируют от 17 до 40 кПа. Необходимо отметить, что опубликованные в литературе значения модуля Юнга сильно различаются и получены при использовании принципиально разных подходов, что затрудняет их сравнение с нашими результатами. Так, например, модуль Юнга для матриксов печени при измерении путём сжатия принимает значения от 1,18 кПа [Evans et al., 2013] до 1,25 кПа [Mattei et al., 2014], в то время как при измерении путём растяжения результаты варьируют от 145 до 18000 кПа [Xiang et al., 2017; Grant et al., 2019; Taylor et al., 2021]. Аналогичный разброс значений при использовании разных методов измерений показан для матриксов лёгких [Jorba et al., 2019] и почек [Taylor et al., 2021].

Как известно, метастазирование опухолей различного типа происходит преимущественно в определённые органы. В отношении рака молочной железы наибольшее количество метастазов регистрируется в костной ткани (60-75% случаев), метастазирование в легкие наблюдается в 32-37% случаев, в печень – в 32-35%, в головной мозг – в 10% [Ibragimova et al., 2023]. При этом локализация метастазов зависит от генетического/метаболического профиля опухоли [Magalhaes et al., 2019; Elia et al., 2021]. Значительно реже наблюдается метастазирование в другие органы, тем не менее, в ряде исследований показано, что рак молочной железы способен метастазировать во множество неспецифических тканей, например, в гинекологические органы [Bogliolo et al., 2010; Kubeček et al., 2017; Karaosmanoglu et al., 2019]. В нашей работе мы проанализировали наличие тканеспецифичности при репопуляции клетками рака молочной железы ДЦЛ матриксов с различными свойствами. Было установлено, что скорость пролиферации клеток действительно зависит от биомеханических свойств матрикса. Клетки MDA-MB-231, имеющие мезенхимальный фенотип и высокий инвазивный потенциал, наиболее успешно пролиферируют в матриксах с низкой общей жесткостью и большим размером пор. Мы предполагаем, что в случае инвазивных клеточных линий большой размер пор матрикса имеет решающее значение, поскольку он не препятствует миграции клеток [Wolf et al., 2009; Sheykhzadeh et al., 2020]. Стоит отметить, что полученные в работе данные о поведении клеточной линии MDA-MB-231 согласуются с ранее представленными доказательствами того, что более жесткий матрикс замедляет пролиферацию клеток MDA-MB-231, одновременно увеличивая их стволовость [Fang et al., 2016]. В свою очередь, клетки SKBR-3, имеющие эпителиальный фенотип, более успешно растут в матриксах с низкой локальной жесткостью матриксных волокон, независимо от размера пор. Скорее всего, это связано с тем, что для неинвазивных линий более важным

фактором являются свойства субстрата в месте контакта, поскольку рост колонии предполагает раздвигание волокон матрикса во время роста клеток [Knowles et al., 2015; Liu et al., 2021].

Влияние ВКМ на клетки рака молочной железы не ограничивается регуляцией скорости пролиферации и особенностями инвазии в ткань. Нами была показана тканеспецифичная экспрессия генов ряда белков, связанных с рецепцией матрикса, его ремоделированием, а также эпителиально-мезенхимальным переходом, при росте клеток в органных матриксах по сравнению с монослоем. Наиболее выраженная качественная взаимосвязь была показана между таким структурным параметром матрикса как размер пор и уровнем экспрессии генов *DDR1*, *NOTCH* и *SNAIL*. Эти наблюдения отражают наличие сложной системы регуляции фенотипа опухолевых клеток, реагирующей на структурные и биомеханические свойства микроокружения. Мы предполагаем, что уменьшение размера пор сопровождается усилением *DDR1*-опосредованной адгезии клеток, что приводит к изменению формы клеток, механоопосредованной активации Notch-зависимого сигнального пути и реструктуризации цитоскелета, что, в свою очередь, является триггером для запуска транскрипционного фактора Snail [Di Martino et al., 2017]. Эти процессы, взаимодействуя между собой, формируют сложную сеть сигнальных путей, в которой участвуют мембранные рецепторы, ядерная оболочка и гены-мишени [Zhang et al., 2016]. С практической точки зрения важной является показанная в большом количестве исследований связь между изменениями представленности транскрипционных факторов, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход, таких как Snail и Notch, и формированием устойчивости к противоопухолевым агентам [Saxena et al., 2011; Ghiso et al., 2017].

Результат проведенного исследования позволяет утверждать, что структурные и биомеханические свойства ВКМ, наряду с биохимическими, являются одним из важных факторов микроокружения опухоли, участвующих в регуляции скорости пролиферации клеток и экспрессии генов, связанных с ремоделированием матрикса и фенотипической пластичностью. Дальнейшее изучение этих факторов, а также механизмов, по которым они осуществляют своё влияние на клетки, может стать основой для создания новых методов диагностики и таргетного противоопухолевого лечения, основанного на нормализации состава и структуры матрикса опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол децеллюляризации, универсально применимый к широкому спектру органов мыши и обеспечивающий высокую степень очистки получаемых бесклеточных матриксов (более 99% по содержанию нуклеиновых кислот) при сохранении нативной архитектоники ткани.

2. Показано, что матриксы органов мыши, включая легкие, печень, селезенку, яичник, почки, существенно отличаются по размеру пор, диаметру волокон, параметрам общей жесткости на уровне трехмерной структуры ткани и локальной жёсткости волокон. Так, матрикс лёгких характеризуется наименьшей общей (17 кПа) и локальной (2,9 кПа) жесткостью при максимальном размере пор; наибольшая общая жесткость показана для матрикса селезенки (40 кПа), а локальная жесткость — для матрикса яичника (6,5 кПа) и печени (6,1 кПа). В совокупности это позволяет говорить об уникальности структурных и биомеханических свойств каждого типа органного матрикса

3. Структурные и биомеханические свойства матриксов оказывают

существенное влияние на заселение опухолевыми клетками. Для клеток MDA-MB-231, обладающих мезенхимальным фенотипом, показана отрицательная корреляция пролиферативного потенциала с общей жесткостью органного матрикса и выраженная тенденция к положительной связи с размером пор. Для клеток с эпителиальным фенотипом, SKBR-3, определяющую роль играла локальная жесткость волокон; в этом случае также показана отрицательная корреляция с пролиферативным потенциалом. Существенного изменения морфологии клеток при их росте в матриксе по сравнению с монослойной культурой не зарегистрировано.

4. Установлено, что рост клеток в органных матриксах сопровождается динамическим тканеспецифичным изменением экспрессии генов рецепторов DDR1 и Notch и транскрипционного фактора Snail, причём усиление экспрессии связано в первую очередь с таким структурным параметром матрикса как размер пор. Отмечены изменения экспрессии гена металлопротеиназы MMP9, однако значимой корреляции с исследованными параметрами матрикса обнаружено не было.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК:

1. **Pospelov A.D.**, Kutova O.M., Efremov Y.M., Nekrasova A.A., Trushina D.B., Geftter S.D., Cherkasova E.I., Timofeeva L.B., Timashev P.S., Zvyagin A.V. Breast cancer cell type and biomechanical properties of decellularized mouse organs drives tumor cell colonization // *Cells*, 2023. V. 12(16), 2030.

2. Kutova O.M., **Pospelov A.D.**, Balalaeva I.V. The multifaceted role of connexins in tumor microenvironment initiation and maintenance // *Biology (Basel)*, 2023. V. 12(2), 204.

3. Sencha L.M., Dobrynina O.E., **Pospelov A.D.**, Guryev E.L., Peskova N.N., Brilkina A.A., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Real-time fluorescence visualization and quantitation of cell growth and death in response to treatment in 3d collagen-based tumor model // *International Journal of Molecular Science*, 2022. V. 23(16). 8837.

4. Kutova O.M., **Pospelov A.D.**, Krylova L.V., Gorshkova E.N., Balalaeva, I.V. Adhesion proteins profile and localization in ovarian carcinoma cell lines. // *Opera Medica et Physiologica*, 2021. V. 8(2). P. 43-54.

5. Kutova O.M., Sencha L.M., **Pospelov A.D.**, Dobrynina O.E., Brilkina A.A., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Comparative analysis of cell-cell contact abundance in ovarian carcinoma cells cultured in two- and three-dimensional in vitro models // *Biology (Basel)*, 2020. V. 9(12), 446.

6. **Pospelov A.D.**, Timofeeva L.B., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Comparative analysis of two protocols of mouse tissues decellularization for application in experimental oncology // *Opera Medica et Physiologica*, 2020. V. 7(4). P. 13–21.

7. Sokolova E.A., Kutova O.M., Grishina A.I., **Pospelov A.D.**, Guryev E.L., Schulga A.A., Deyev S.M., Balalaeva I.V. Penetration efficiency of antitumor agents in

ovarian cancer spheroids: the case of recombinant targeted toxin DARPin-LoPE and the chemotherapy drug, doxorubicin // *Pharmaceutics*, 2019. V. 11(5), 219.

Материалы конференций

8. **Поспелов А.Д.**, Кутова О.М., Ефремов Ю.М., Некрасова А.А., Трушина Д.Б., Гефтер С.Д., Черкасова Е.И., Тимофеева Л.Б., Тимашев П.С., Звягин А.В., Балалаева И.В. Особенности фенотипа клеток рака молочной железы при культивировании в бесклеточных органных матриксах с разными структурно-механическими свойствами // Тезисы докладов 12й международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Серпухов, 2023. С. 684-688.

9. **Поспелов А.Д.**, Кутова О.М., Ефремов Ю.М., Некрасова А.А., Трушина Д.Б., Гефтер С.Д., Черкасова Е.И., Тимофеева Л.Б., Тимашев П.С., Звягин А.В., Балалаева И.В. Взаимосвязь между структурно-механическими свойствами внеклеточного матрикса и его способностью к репопуляции опухолевыми клетками на примере децеллюляризованных органов // Тезисы докладов VII Съезда биофизиков России, Краснодар, 2023. С. 144-145.

10. **Поспелов А.Д.**, Гефтер С.Д., Трушина Д.Б., Евремов Ю.М., Балалаева И.В. Особенности морфологии и инвазивной активности различных линий рака молочной железы в зависимости от биомеханических свойств внеклеточного матрикса // Тезисы докладов Школы-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2022. С. 686.

11. **Поспелов А.Д.**, Гефтер С.Д., Трушина Д.Б., Балалаева И.В. Влияние архитектоники и жесткостных характеристик внеклеточного матрикса на морфологию клеток рака яичников // Тезисы докладов 75-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2022. С. 181.

12. **Поспелов А.Д.**, Гефтер С.Д., Трушина Д.Б., Ефремов Ю.М., Балалаева И.В. Влияние трёхмерной структуры и жесткостных характеристик модели на основе децеллюляризованного матрикса на морфологию и инвазивный потенциал различных линий клеток рака молочной железы // Тезисы докладов XXVII Нижегородской сессии молодых учёных, Нижний Новгород, 2022. С. 236-238.

13. **Pospelov A.D.**, Kutova O.M., Efremov Y.M., Nekrasova A.A., Trushina D.B., Gefter S.D., Cherkasova E.I., Timofeeva L.B., Timashev P.S., Zvyagin A.V., Balalaeva I.V. Relationship between structural-mechanical properties of extracellular matrix and its ability to repopulation by cancer cells studied on decellularized organs // *Materials of the 8th International Conference on Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets*, Rhodos, Greece. 2022. Электронный ресурс. <https://www.aegeanconferences.org/src/App/sessions/posters/161> (условия доступа: для зарегистрированных пользователей).

14. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Тимофеева Л.Б., Балалаева И.В. Особенности роста и фенотипа клеток линии SKOV-3 при репопуляции матриксов различных органов мыши // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2021. С. 175.

15. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Балалаева И.В. Влияние внеклеточного матрикса различных органов мыши на особенности роста и фенотипа опухолевых

клеток // Тезисы докладов XXVI Нижегородской сессии молодых учёных, Нижний Новгород, 2021. С. 175-177.

16. **Pospelov A.D.**, Cherkasova E.I., Timofeeva L.B., Balalaeva I.V., Features of the growth and phenotype of tumor cells during the repopulation of matrices of various murine organs // Materials of International conference “Tumor Heterogeneity, Plasticity and Therapy (virtual edition)”, 2021.

17. **Pospelov A.D.** Influence of rigidity and architectonics of a three-dimensional recellularized model on the morphology and phenotype of ovarian cancer // Materials of UK-Russia Conference Advanced biomaterials to combat cancer, Lankaster, UK, 2021.

18. Sencha L.M., Kutova O.M., **Pospelov A.D.**, Dobrynina O.E., Balalaeva I.V. Phenotypic plasticity of ovarian carcinoma cells lead to higher resistance to treatment when cultivated in collagen-based 3D model // Materials of International conference 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 2021.

19. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Балалаева И.В. Особенности роста опухолевых клеток при репопуляции бесклеточных органных матриксов // Тезисы докладов VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика» (ТКМФ-7), Троицк, 2020. С. 211-212.

20. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Балалаева И.В. Особенности роста опухолевых клеток при репопуляции бесклеточных органных матриксов // Тезисы докладов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино, 2020. С. 291.

21. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Тимофеева Л.Б., Балалаева И.В. Морфологические характеристики опухолевых клеток при репопуляции бесклеточных органных матриксов // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2020. С. 171.

22. **Поспелов А.Д.**, Экспериментальное сравнение методик химической децеллюляризации для получения органных матриксов мыши // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием VolgaMedScience, Нижний Новгород, 2020. С. 57-58.

23. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Тимофеева Л.Б., Балалаева И.В. Получение бесклеточных органных матриксов и их репопуляция опухолевыми клетками // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Молекулярные и клеточные основы патологии», Санкт-Петербург, 2020. С. 109.

24. **Поспелов А.Д.**, Черкасова Е.И., Балалаева И.В. Экспериментальное сравнение методик химической децеллюляризации для получения органных матриксов мыши // Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2019. С. 177.

25. **Поспелов А.Д.**, Сравнительный анализ методик получения децеллюляризованных органных матриксов мыши для задач экспериментальной онкологии // Тезисы докладов международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2019. С. 21.

26. **Поспелов А.Д.**, Воловецкий А.Б., Черкасова Е.И., Брилкина А.А., Балалаева И.В. Получение и гистоморфологический анализ бесклеточных органных матриксов лабораторных животных // Тезисы докладов 71-й Всероссийской с

международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2018. С. 182.

27. **Поспелов А.Д.**, Воловецкий А.Б., Брилкина А.А., Балалаева И.В. Получение бесклеточных органных матриксов лабораторных животных // Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2017. С. 137.