

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»**

На правах рукописи

Поспелов Антон Джонович

**Роль биомеханических и структурных свойств органных матриксов
в регуляции пролиферации и фенотипа клеток рака молочной железы**

1.5.2. – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., доцент Балалаева Ирина Владимировна
доцент каф. биофизики ИББМ
ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Нижегород – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Структура и основные компоненты внеклеточного матрикса	15
1.2 Структурные и биомеханические свойства внеклеточного матрикса.....	19
1.2.1 Роль трёхмерной организации волокон матрикса.....	20
1.2.2 Пористость и размер пор матрикса.....	21
1.2.3 Факторы, влияющие на жёсткость внеклеточного матрикса	22
1.2.4 Вязкоупругие свойства внеклеточного матрикса.....	25
1.3 Взаимодействие внеклеточного матрикса с клетками	25
1.3.1 Рецепторы семейства интегринов.....	26
1.3.2 Дискоидин-доменные рецепторы	30
1.3.3. Роль рецепторов Notch в механотрансдукции.....	36
1.4 Роль структурно-механических свойств внеклеточного матрикса в регуляции процессов клеточной миграции и дифференцировки.....	41
1.4.1 Адгезия и распластывание клеток	42
1.4.2 Влияние механических свойств матрикса на клеточную миграцию.....	43
1.4.3 Роль матрикса в дифференцировке стволовых клеток	44
1.4.4 Влияние структуры и механических свойств матрикса на морфогенез.....	45
1.5 Роль матрикса в процессе канцерогенеза и развития опухолей.....	46
1.5.1 Инициация канцерогенеза	47
1.5.2 Влияние механических свойств матрикса на пролиферацию опухолевых клеток.....	48
1.5.3 Миграция и инвазия опухолевых клеток в матриксах с разными биомеханическими свойствами	49
1.6 Использование децеллюляризованных внеклеточных матриксов в экспериментальной онкологии	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1 Лабораторные животные и извлечение органов	57
2.2 Децеллюляризация органов мыши	57
2.3 Анализ содержания ДНК в ткани	59
2.4 Клеточные линии и культивирование клеток.....	60
2.5 Рецеллюляризация матриксов.....	60

2.6	Культирование опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле	62
2.7	Гистоморфологический анализ	63
2.8	Сканирующая электронная микроскопия.....	65
2.9	Макроиндентирование	65
2.10	Наноиндентирование методом атомно-силовой микроскопии	67
2.11	Реометрия	68
2.12	Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.....	69
2.13	Статистическая обработка данных	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		72
3.1	Получение децеллюляризированных матриксов мышечных органов.....	72
3.2	Структурные и биомеханические свойства бесклеточных органических матриксов ..	79
3.2.1	Гистоморфологический анализ ДЦЛ матриксов.....	79
3.2.2	Анализ микроструктуры ДЦЛ матриксов методом сканирующей электронной микроскопии	81
3.2.3	Общая жесткость трехмерной структуры ДЦЛ матриксов	83
3.2.4	Локальная жесткость волокон ДЦЛ матриксов	85
3.3	Рост клеток рака молочной железы при репопуляции органических матриксов с разными структурными и биомеханическими свойствами	87
3.3.1	Скорость роста культур опухолевых клеток в органических матриксах	87
3.3.2	Рост клеток рака молочной железы в коллагеновом гидрогеле	90
3.3.3	Анализ связи между структурными и биомеханическими свойствами матрикса и особенностями роста клеток.....	92
3.4	Особенности фенотипа клеток рака молочной железы при росте в органических матриксах	94
3.4.1	Тканеспецифичное изменение экспрессии генов.....	94
3.4.2	Динамика экспрессии генов при длительном росте клеток в матриксах различных органов	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		107
ВЫВОДЫ.....		113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ВКМ – внеклеточный матрикс

ДЦЛ – децеллюляризированный

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

АСТВ – бета-актин (от англ. actin beta)

ADAM – дизинтегрин и металлопротеиназа (от англ. a disintegrin and metalloproteinase)

АКТ – трансформирующий линию Ак (от англ. Ak strain transforming)

АРС – аденоматозный полипоз кишечной палочки (от англ. adenomatous polyposis Coli)

Cdc42 – белок контроля клеточного деления (от англ. cell division control protein)

DDR – дискоидин–доменные рецепторы (от англ. discoidin-domain receptor)

Dll – дельта-подобные лиганды (от англ. delta-like)

DMEM – среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (от англ. Dulbecco's modified Eagle medium)

EDTA – этилендиаминтриуксусная кислота (от англ. ethylenediaminetetraacetic acid)

EGF – эпидермальный фактор роста (от англ. epidermal growth factor)

ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (от англ. extracellular signal regulated kinase)

ФАК – киназа фокальной адгезии (от англ. focal adhesion kinase)

FGF – фактор роста фибробластов (от англ. fibroblast growth factor)

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (от англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid)

HER2 – рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (от англ. human epidermal growth factor receptor 2)

IL-8 – интерлейкин 8 (от англ. interleukin 8)

ITGB1 – субъединица интегрина $\beta 1$ (от англ. integrin-beta 1)

LINC – линкер ядерного скелета и цитоскелета (от англ. linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (от англ. mitogen-activated protein kinases)

MMP9 – матриксная металлопротеаза 9 (от англ. matrix metalloproteinase 9)

MRTF α – миокардин-ассоциированный транскрипционный фактор альфа (от англ. myocardin-related transcription factor)

N/C – ядерно-цитоплазматическое соотношение (от англ. nuclear-cytoplasmic ratio)

NECD – внеклеточный домен Notch (от англ. Notch extracellular domain)

NICD – внутриклеточный домен Notch (от англ. Notch intracellular domain)

NRR – негативная регуляторная область (от англ. negative regulation region)

NTM – трансмембранно-внутриклеточный домен Notch (от англ. Notch transmembrane domain)

PBS – фосфатный буфер (от англ. phosphate buffered saline)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (от англ. phosphoinositide-3-kinase)

РТВ – фосфотирозин-связывающий домен (от англ. phosphotyrosine-binding domain)

PUM1 – белок-гомолог Pumilio 1 (от англ. Pumilio homolog 1)

SD – среднее квадратичное отклонение (от англ. standard deviation)

SDC – дезоксихолат натрия (от англ. sodium deoxycholate)

SDS – додецилсульфат натрия (от англ. sodium dodecyl sulfate)

SH2 – гомолог Src (от англ. Src homology)

Shc – трансформирующий Src содержащий белок (от англ. Src homology 2 domain containing transforming protein)

SRC – протеинкиназа семейства Src (от сокр. англ. sarcoma)

STAT1/3 – фактор, передающий сигнал и активирующий транскрипцию (от англ. signal transducer and activator of transcription)

TAZ – транскрипционный ко-активатор с PDZ-ясвязывающим мотивом (от англ. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)

TGF β – трансформирующий фактор роста бета (от англ. transforming growth factor beta)

Wnt5a – бескрылый, интеграция 1 (от англ. W (wingless) и Int (integration 1))

YAP – белок ассоциированный с Yes (от англ. Yes-associated protein)

ВВЕДЕНИЕ

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 определяет биохимический и биомеханический профиль матрикса [1]. Химический состав и структура ВКМ варьируют между тканями, что делает каждый орган уникальным с точки зрения взаимодействия клеток с матриксом [2]. 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 [1], дифференцировки [3], миграции [4], контроля клеточной смерти [5], метастазирования [6] и ухода от иммунного надзора [7].

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 [8] и дискоидин-доменные рецепторы (DDR) [9]. Большую роль в интерпретации полученного сигнала с учетом общего контекста микроокружения играет рецептор межклеточного взаимодействия Notch [10]. 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 [11-13]. 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 [10].

Исследования влияния биомеханических свойств ВКМ на рост и развитие опухолевых клеток в настоящее время получили активное развитие [14,15]. 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 [16], резистентность к ингибиторам роста [16], уход малигнизированных клеток от апоптоза [17], их неограниченный репликативный потенциал [18], тканевую инвазию опухоли и метастазирование [19]. Необходимо отметить, что вопрос о роли биомеханических свойств матрикса остается открытым, поскольку экспериментальные данные зачастую противоречивы и, как правило, получены на экспериментальных моделях, сильно отличающихся от реальной ткани [20,21].

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 [22]. Полученный материал может быть использован в качестве биосовместимого каркаса для создания моделей опухолевого роста [23-25], что имеет важное значение для изучения взаимодействий между клетками и матриксом [26,27]. Преимуществами таких моделей является 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 формирование клеточных кластеров [24,25]. 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 [27,28].

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) [14,29,30]. Развитие методов предупреждения и лечения опухолей требует понимания роли каждого из этих факторов. В связи с этим, изучение особенностей биомеханических свойств ВКМ и их связь 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 роста 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) жёсткость, 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

Надежность 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 ученых «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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2020); VII

Троицкой конференции с международным участием "Медицинская физика" (ТКМФ-7) (Троицк, 2020); Пятая Всероссийская конференция молодых ученых и студентов с международным участием VolgaMedScience (Нижний Новгород, 2020); Всероссийской конференции молодых ученых и студентов «Молекулярные и клеточные основы патологии» (Санкт-Петербург, 2020); Нижегородской сессии 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 молодежной 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 опубликовано 27 работ, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (индексация в Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК.

Структура и объем работы

Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объем 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура и основные компоненты внеклеточного матрикса

Живой организм является сложной трёхмерной многокомпонентной средой, мельчайшей структурной и функциональной единицей которого является клетка. Однако для обеспечения адекватной структуры ткани и корректного взаимного расположения клеток требуется нечто большее, чем просто взаимодействие клеток друг с другом. Пространство между клетками заполнено веществом, получившим название внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ состоит из белков, таких как коллаген и эластин, а также протеогликанов и гликопротеинов, синтезируемых резидентными клетками, причём состав и структура матрикса в значительной степени определяют свойства всей ткани [31]. ВКМ часто рассматривают как каркас тканей и органов, однако его функции включают в себя намного больше, чем просто обеспечение физической поддержки для клеток. ВКМ участвует в регуляции большого количества важных клеточных процессов, включая адгезию, дифференцировку, пролиферацию, миграцию и даже апоптоз [32,33]. Такое разноплановое влияние матрикса на клетки обусловлено широким спектром разнообразных соединений, входящих в его состав, их биохимическими и биомеханическими свойствами, позволяющими взаимодействовать с мембранными рецепторами и активировать сигнальные каскады, влияющие на жизнедеятельность клетки [34,35].

Компоненты ВКМ синтезируются локально, в основном за счёт фибробластов, специализированных клеток соединительной ткани [36]. Структура ВКМ динамична и подвергается непрерывному ремоделированию, в процессе которого происходят изменения состава и архитектоники. В этих преобразованиях участвуют резидентные клетки ткани, что позволяет сделать вывод о необходимости постоянной перестройки матрикса для поддержания гомеостаза клеточного микроокружения [3,37]. Упрощённая схема строения внеклеточного матрикса приведена на рисунке 1.

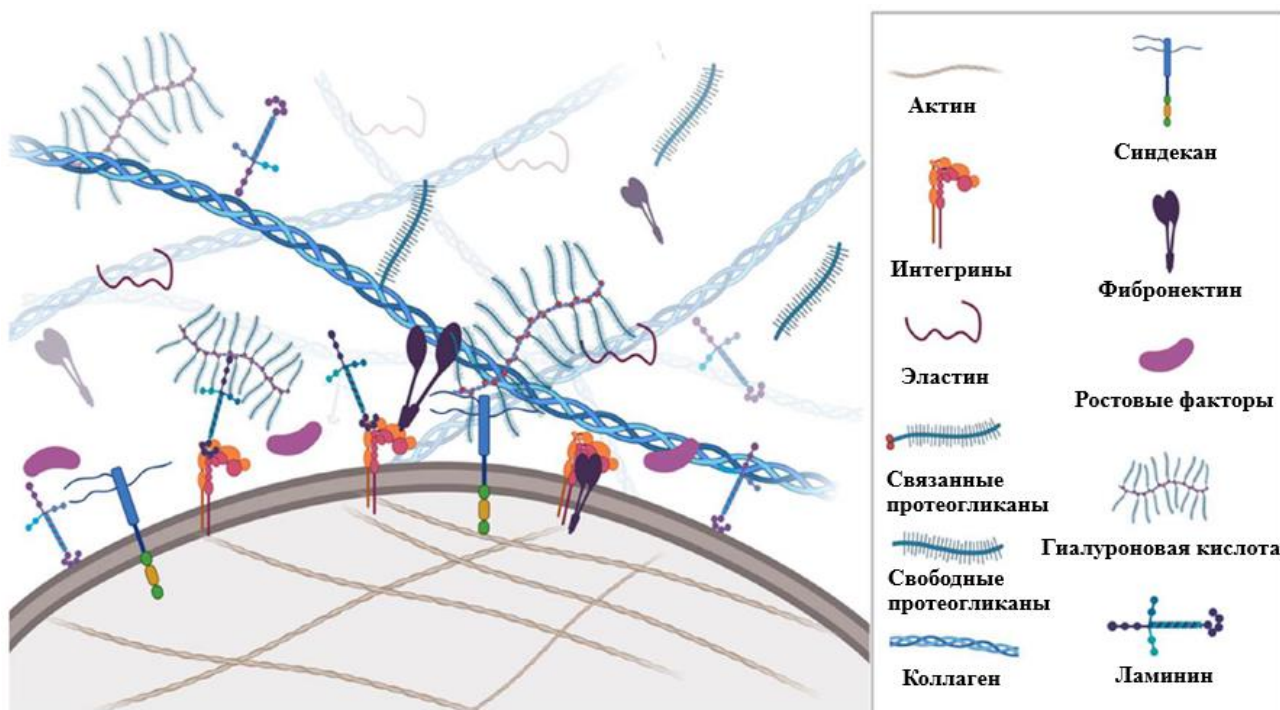


Рис. 1. Упрощённая схема строения внеклеточного матрикса и его основных компонентов. Адаптировано из [38]

Коллаген

Коллагены составляют около 30% всех белков позвоночных животных и являются главным компонентом внеклеточного матрикса. Стандартная коллагеновая молекула состоит из трёх одинаковых (гомотримеры) или разных (гетеротримеры) полипептидных цепей. Они характеризуются повторяющейся последовательностью Gly-X-Y, где X — обычно пролин, а Y — чаще всего пролин или 4-гидроксипролин. Переплетающиеся полипептидные цепи формируют характерную трёхспиральную структуру [39]. За счет многочисленных внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок формируются микрофибриллы и структуры более высокого порядка. Среди получающихся в результате разнообразных надмолекулярных структур выделяют фибриллярные и нефибриллярные виды коллагенов. Суммарно, у человека выделяют 28 типов коллагена, каждый из которых выполняет свою функцию и является доминирующим в определённой ткани или на определённом этапе развития

организма [40,41].

Изначально считали, что коллагены выполняют только механическую, поддерживающую функцию, однако на данный момент известно, что их роль намного шире. Коллагены участвуют в регуляции процесса клеточной адгезии в качестве лигандов клеточных рецепторов [42], миграции клеток (контактное наведение) [43] и реконструкции тканей [44].

Эластин

Эластин — это гидрофобный фибриллярный белок, который обязан своими характерными эластичными свойствами большому количеству межмолекулярных ковалентных сшивок [45]. Мономером эластина является тропоэластин, синтезируемый фибробластами, эндотелиоцитами, хондроцитами и кератиноцитами. Тропоэластин спонтанно собирается в полимерные структуры за счёт взаимодействий между гидрофобными доменами. Эластин входит в состав эластических волокон, образуя ядро (около 90% всей структуры), покрытое оболочкой из микрофибрилл, состоящей в основном из гликопротеинов из группы фибриллина (фибриллин-1 и -2) [46,47]. Такие эластичные волокна придают тканям способность к обратимому растяжению. Они являются особенно важным компонентом стенок кровеносных сосудов, кожи, легких, сердца, сухожилий, связок, мочевого пузыря, эластичной хрящевой ткани (например, ушной раковины, гортани, надгортанника) и т.д. [1,48].

Протеогликаны

Протеогликаны — это комплексные молекулы со сложной трёхмерной структурой. Они состоят из белкового ядра, ковалентно связанного с одной или несколькими цепями гликозаминогликанов, которые представляют собой линейные гетерополисахариды. Исходя из химической структуры полисахаридной цепи, различают четыре основные группы гликозаминогликанов: гепарансульфат, кератансульфат, хондроитинсульфат/дерматансульфат и гиалуроновую кислоту [1,49,50]. Цепи

гликозаминогликанов (и, следовательно, протеогликанов в целом) заряжены отрицательно, что является результатом наличия многочисленных карбоксильных и сульфатных остатков в их структуре [51]. Из-за сильного отрицательного заряда эти молекулы имеют тенденцию удлиняться в растворе в физиологических условиях, что позволяет им связывать большое количество воды и образовывать гель. Такие свойства обеспечивают тканям устойчивость к деформации при воздействии высоких физических нагрузок, примером чего является агрекан, наиболее важный протеогликан хряща [52]. Семейство протеогликанов также включает соединения с различными регуляторными функциями. Сюда относятся трансмембранные рецепторы синдеканы, связывающие многочисленные присутствующие в ВКМ лиганды и опосредующие передачу сигнала, клеточную адгезию и миграцию [53]; внутриклеточный протеогликан серглицин, регулирующий гранулопоэз лейкоцитов [54]; характерные для базальной мембраны перлекан и агрин, регуляторы многих клеточных процессов, включая участие агрина в формировании нервно-мышечных синапсов [55,56]; фибромодулин, участвующий в фибрилlogenезе коллагена [57].

Гликопротеины

Как и протеогликаны, гликопротеины состоят из белкового ядра и ковалентно связанных с ним углеводных частей, однако сахаридные цепи намного короче и обычно разветвлены [58]. Чаще всего гликопротеины играют роль связующих единиц ВКМ, поскольку у них имеются функциональные группы для присоединения других белков, ростовых факторов или рецепторов [59]. Их участие необходимо для многих биологических процессов, в том числе оплодотворения, иммунной и воспалительной реакции, свертывания крови, заживления ран и т.д. [60-63].

Двумя наиболее важными гликопротеинами являются фибронектин и ламинин. Фибронектин содержит домены, способные взаимодействовать с

другими белками ВКМ (например, коллагеном), гликозаминогликанами, поверхностными рецепторами и другими молекулами фибронектина. Благодаря этим свойствам фибронектин может одновременно связываться с клетками и компонентами окружающего матрикса [64,65]. В организме фибронектин существует в двух формах: растворимый фибронектин плазмы (синтезируется гепатоцитами и выделяется в кровь) и нерастворимый клеточный фибронектин (вырабатывается фибробластами, эндотелиальными клетками, хондроцитами, миоцитами и другими). Нерастворимая форма представляет собой фибриллярную структуру, как бы сшивающую поверхности клетки и ВКМ. Фибронектин отвечает за клеточную адгезию, пролиферацию, миграцию и правильное распределение других белков ВКМ [66,67].

Ламинины представляют собой группу крупных многодоменных гликопротеинов гетеротримерной структуры. Белки семейства ламининов являются неотъемлемой частью базальной мембраны и играют существенную роль в формировании и поддержании ее структуры, что позволяет обеспечивать механические свойства эпителиальной ткани [68,69].

Семейство гликопротеинов также включает фибулины [70], тенасцин [71], фибриноген [72], витронектин [73], остеоонектин [74], костный сиалопротеин [75] и рилин [76].

1.2 Структурные и биомеханические свойства внеклеточного матрикса

ВКМ характеризуется рядом микро- и макроскопических особенностей, которые определяют его физические свойства. В настоящее время в литературе выделяют следующие ключевые структурные и биомеханические параметры матрикса: взаиморасположение волокон, размер пор и пористость, жёсткость (или эластичность), вязкоупругость, амплитуда статических и динамических деформаций (растяжение, сжатие или сдвиг), частота циклических деформаций [77,78].

1.2.1 Роль трёхмерной организации волокон матрикса

Микроскопические и ультраструктурные особенности матрикса играют важную роль в регуляции поведения клеток, определяя возможность миграции [79] или влияя на тканеспецифический фенотип клеток [80]. Например, базальная мембрана, обладающая высоко упорядоченной и плотной сетью волокон, может в значительной степени предотвращать миграцию клеток в нижележащие слои ткани. В свою очередь рыхлая структура матрикса может, наоборот, стимулировать клетки к дальнейшей миграции [79,81].

Трёхмерная архитектура коллагеновых волокон матрикса играет важную роль в определении его биомеханических свойств. Следует отметить, что взаимное расположение волокон и их выстраивание в геометрические последовательности зависят от функции исходной ткани. Например, коллагеновые волокна связок и сухожилий ориентированы вдоль длинной оси ткани, что позволяет обеспечивать высокую устойчивость к растяжению при нагрузке [82]. Другим примером может служить характерная структура коллагеновых волокон в подслизистой оболочке тонкого кишечника. Здесь два разных типа волокон располагаются вдоль продольной оси органа с центроидами, смещенными на 30° . Такое спиралевидное расположение коллагеновых волокон с прилегающим к ним слоем гладкомышечных клеток позволяет тонкому кишечнику сокращаться, обеспечивая перемещение пищевого комка. Когда такой матрикс подвергается двухосному механическому испытанию (растяжение как в продольном, так и в поперечном направлении для определения анизотропного поведения материала), описанная выше ориентация волокон является причиной анизотропного биомеханического поведения с большей прочностью и касательным модулем деформации вдоль направления волокон [83].

Степень относительного взаимного выравнивания коллагеновых волокон в матриксе обычно изменяется в зависимости от приложения нагрузки.

Коллагеновые волокна не только взаимно распрямляются для достижения выравнивания относительно вектора приложенной силы, но также могут подвергаться дополнительному скручиванию для противодействия прилагаемой силе. Такое изменение коллагеновых волокон обратимо до тех пор, пока ткань не достигнет специфичного для неё максимального напряжения [84]. При больших асимметричных деформациях изменения конфигурации волокон становятся постоянными, что приводит к нарушению естественных биомеханических свойств ткани. В ряде исследований было продемонстрировано, что расположение волокон изменяется в зависимости от направления, в котором прикладывается механическое усилие [85]. Так, например, в результате продольного натяжения волокна выстраиваются вдоль продольной оси ткани. При этом в случае разнонаправленного натяжения, выравнивания волокон не происходит. Таким образом, основываясь на понимании архитектуры коллагеновых волокон ВКМ можно сделать определенные прогнозы относительно его физических и механических свойств.

1.2.2 Пористость и размер пор матрикса

Пористость — это параметр, который относится к доле объема геля, заполненного жидкой фазой, которая представляет собой объем пустот вокруг молекул матрикса на единицу объема геля. Размер пор — это другой параметр, который, в отличие от пористости, напрямую относится к геометрии пор. Для многих синтетических полимеров простого состава средний размер пор коррелирует с пористостью, однако для природных полимеров прямой корреляции нет, поскольку диаметр коллагеновых фибрилл может варьировать от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров [86].

Считается, что адгезия и подвижность клеток зависят от размера пор, но не от пористости [87]. В то же время оба параметра влияют на проницаемость матрикса для малых молекул (питательных веществ, гормонов и кислорода) и высокомолекулярных соединений [87].

1.2.3 Факторы, влияющие на жёсткость внеклеточного матрикса

Жёсткость — способность твёрдого тела, конструкции или её элементов сопротивляться деформации от приложенного усилия вдоль выбранного направления в заданной системе координат [88]. Когда материал подвергается растягивающему (или сжимающему) усилию, он обычно удлиняется (или сжимается соответственно) в направлении приложенного усилия [89]. Поведение эластичных материалов, которые обладают линейной зависимостью «напряжение-деформация», может быть хорошо описано с помощью единственного параметра — модуля Юнга (E), рассчитываемого как отношение между напряжением (нагрузкой, деленной на площадь поверхности образца, перпендикулярной приложенной нагрузке) и относительной деформацией.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (1)$$

где E – модуль Юнга, σ – напряжение, ε – относительная деформация.

Эта величина также часто называется жесткостью, эластичностью или модулем упругости ткани.

Биологические ткани, как и большинство полимеров, проявляют линейную упругость при незначительных деформациях, обычно в пределах 5% [90]. Однако при деформациях, превышающих 5%, для многих тканей *in vivo* кривая «напряжение-деформация» становится нелинейной (нелинейная эластичность) [91]. Костная ткань относится к пластичным материалам, не возвращающимся к своей первоначальной форме после больших деформаций [89].

Большинство клеток и тканей в организмах испытывают также деформацию сдвига, возникающую, когда напряжение приложено параллельно поверхности, к которой прикреплена ткань или клетка. Например, эндотелиальные клетки сосудов подвержены напряжению сдвига в кровеносных сосудах из-за потока жидкости, который параллелен обращенной к крови поверхности клеток. Сходная ситуация имеет место для эпителиальных клеток кишечника.

Напряжение сдвига пропорционально деформации сдвига с коэффициентом G (модуль сдвига).

$$G = \frac{E}{2(1 + \mu)} \quad (2)$$

где G – модуль сдвига, E – модуль Юнга, μ – коэффициент Пуассона.

Модуль сдвига материала связан с модулем Юнга: для биологических материалов, которые практически несжимаемы, E приблизительно равно трехкратному G [92].

Необходимо отметить, что, в связи с тем, что архитектура природных тканей достаточно комплексна, жёсткость биологической ткани не может быть определена исходя из жёсткости отдельных её компонентов. Большинство биологических тканей состоят из множества супрамолекулярных структур, например, базальные мембраны содержат две переплетающиеся, независимо сшитые сети с очень разными механическими свойствами: на основе коллагена IV и ламинина [59]. Некоторые ткани, такие как артериальная стенка, многослойны, и каждый слой обладает своими собственными упругими свойствами, что обеспечивает функциональную нелинейность кривой «напряжение-деформация» [92]. Таким образом, 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 [3].

В связи с особенностями сложной структуры и свойств биологических тканей в настоящее время в биомеханике разделяют измерения «локальной» жёсткости, на уровне отдельных волокон или клеток (микроуровень) и «общей» жёсткости всей ткани (макроуровень) [77]. В отношении ВКМ измеренные значения жёсткости отдельных волокон могут существенно отличаться от жёсткости всего матрикса. В соответствии с представлениями теории сопротивления материалов, ВКМ является статически неопределимой системой,

в которой усилия распределяются пропорционально жесткостям отдельных элементов [93]. Общая жесткость таких систем, помимо жесткости структурных элементов, зависит от их количества и взаимного расположения. Наибольшее влияние на общую жёсткость конструкции оказывают точки наибольших перемещений системы, деформируемой под действием нагрузки, при этом элементы растяжения-сжатия, расположенные по направлению перемещений, могут предотвратить эти перемещения и увеличить общую жесткость. Например, хорошо известно, что присутствие в конструкции диагонально расположенных элементов, т.е. диагональных связей, работающих на растяжение или сжатие, приводит к резкому возрастанию общей жёсткости системы, поскольку жёсткость растягиваемого стержня во много раз выше изгибной жесткости [94].

Распределение деформации внутри системы (и, соответственно, изменение жесткости системы по сравнению с жесткостью её отдельных элементов) при известных внешних нагрузках и структуре самой системы можно определить исходя из условия совместности деформации, согласно которому деформации внутри объекта должны быть согласованы и согласовываться с внешними нагрузками [95]. В отношении ВКМ, к сожалению, применение стандартных точных методов анализа деформации, принятых в механике, невозможно, так как на данный момент не существует методов, позволяющих достоверно и неразрушающим образом определить геометрию и взаиморасположение волокон ВКМ на глубину всей ткани [96]. Тем не менее очевидно, что из-за сложной архитектоники ВКМ локальная жесткость отдельных волокон будет так или иначе отличаться от жесткости матрикса в целом [97]. Это подтверждается опубликованными данными разных исследовательских групп, согласно которым жёсткость волокон ВКМ в разных тканях варьирует от 2 до 15 кПа [98,99], тогда как общая жёсткость тканей или полученных из них бесклеточных органических матриксов от очень мягких тканей головного мозга (с модулем Юнга порядка 10 Па) заканчивая очень жесткими костями (до 109 кПа) [100].

1.2.4 Вязкоупругие свойства внеклеточного матрикса

Материал называется вязкоупругим, если для него зависимость деформации от приложенного напряжения характеризуется наличием петли гистерезиса между кривыми нагрузки и разгрузки [78]. Такой материал имеет как упругие, так и вязкие (диссипативные) структурные элементы. При постоянном напряжении вязкоупругий материал демонстрирует релаксацию напряжений: со временем материал становится менее напряженным из-за рассеивания упругой энергии потоком его вязкой части (например, движением жидкости).

Большинство биологических тканей, включая кожу, сухожилия, стенки артерий и хрящи, являются вязкоупругими материалами [92]. Одна из причин наличия таких свойств связана с потоками вязких жидкостей, пропитывающих ткань, которые возникают в процессе деформации. Другой причиной вязкоупругих свойств тканей является скольжение макромолекул матрикса относительно друг друга [101].

Вязкоупругие характеристики матрикса связаны с циклическими динамическими нагрузками на клетки, обеспечивающими регулярную перестройку цитоскелета и смену профиля экспрессии [102]. Характеристикой вязкоупругих свойств биологических тканей является комплексный модуль сдвига G , который включает упругую составляющую — модуль накопления, и диссипативную или вязкую составляющую — модуль потерь [101].

$$G = \frac{G'}{G''} \quad (3)$$

где, G – комплексный модуль сдвига, G' - модуль накопления, G'' - модуль потерь.

1.3 Взаимодействие внеклеточного матрикса с клетками

Ткани *in vivo* постоянно подвергаются механическим воздействиям, приводящим к сложным растягивающим и сжимающим напряжениям, которые

клетки должны как-то определить и должным образом отреагировать на них в целях поддержания гомеостаза [103-105]. Установленное к настоящему моменту влияние механических особенностей внеклеточного матрикса на экспрессию генов, миграцию клеток и особенности их дифференцировки позволяет предполагать, что клетки способны ощущать физические характеристики своего микроокружения наряду с химическим составом [106,107].

На данный момент выделяют большое количество разнообразных клеточных сенсорных белков, которые способны «считывать» биомеханические параметры ВКМ. К наиболее важным прямым сенсорам относят интегрины и семейство дискоидин-доменных рецепторов, а к непрямым — семейство белков Notch [108,109].

1.3.1 Рецепторы семейства интегринов

Интегрины передают сигналы между внеклеточной средой и внутриклеточными регуляторными путями, обеспечивая коммуникацию в обоих направлениях, «outside-in» и «inside-out» [110]. Интегрины представляют собой гетеродимерные рецепторы, существующие по меньшей мере в 24 уникальных комбинациях нековалентно взаимодействующих α -субъединиц (18 типов) и β -субъединиц (8 типов) [111]. Альфа-субъединицы и β -субъединицы интегринов являются трансмембранными белками типа I, состоящими из большого внеклеточного домена, однопроходной трансмембранной спирали и короткого цитоплазматического домена. Вновь синтезированные α - и β -субъединицы интегрин гетеродимеризуются в эндоплазматическом ретикулуме и в виде облигатных гетеродимеров перемещаются на поверхность клетки [112]. Характерной особенностью интегринов является их способность связываться с несколькими различными лигандами ВКМ [113]. Кроме того, связывание интегрин с другими представленными на мембране молекулами, такими как рецепторы факторов роста [114], протеогликаны [115] и тетраспанины, влияет на конформацию интегрин, его активацию и участие в регуляции клеточных

функций [116]. Упрощённая схема интегрин-ассоциированных сигнальных путей приведена на рисунке 2.

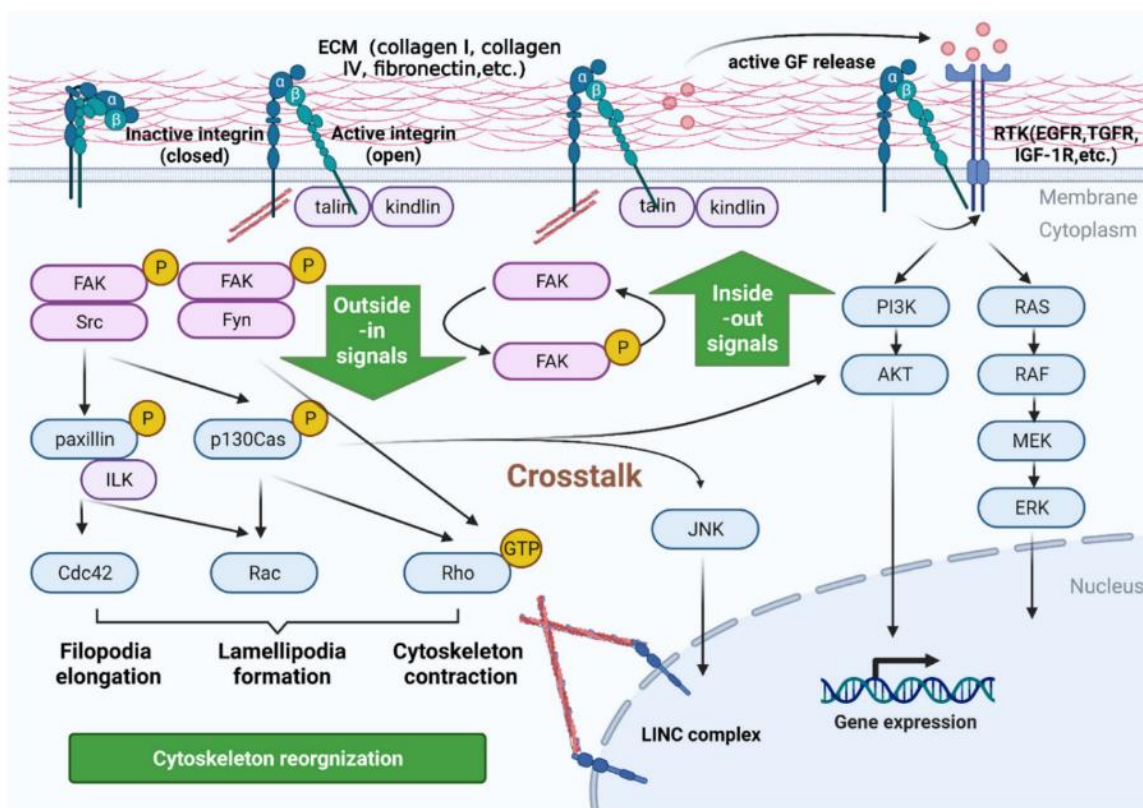


Рис. 2. Упрощённая схема интегрин-опосредованных сигнальных путей [117]

Биохимическая активация интегрина «inside-out» включает связывание внутриклеточного адапторного белка талина с цитоплазматическим хвостом β -субъединицы интегрина. Это индуцирует пространственное разделение цитоплазматических доменов α - и β -субъединиц интегрина и запускает глобальное конформационное изменение во внеклеточном домене. Связывание талина играет ключевую роль на первых этапах активации интегрина во всех типах клеток, которая затем поддерживается связыванием дополнительных цитоплазматических эффекторов, опосредующих также объединение интегринов во множество различных типов фокальных адгезивных комплексов, обеспечивающих связывание клетки с ВКМ. Помимо талина, основным эффектором передачи интегриновых сигналов во внеклеточное пространство

является киндлин. Он, во-первых, поддерживает активацию интегрин посредством связывания с цитоплазматической частью β -субъединицы [118], а во-вторых, задействует паксиллин, активирующий ряд сигнальных каскадов [119]. При созревании фокального контакта привлекаются дополнительные интегрины и другие молекулы, включая тензина 1 и тензина 3, которые, как и талин, соединяют интегрин с актином цитоскелета [120].

Интегринопосредованное взаимодействие клетки с матриксом регулируется на нескольких уровнях. Сродство интегринов к своим лигандам динамически регулируется посредством обратной связи с участием запускаемых сигнальных каскадов. Кроме того, взаимодействие интегринов с матриксными лигандами и их последующая кластеризация запускают накопление адаптерных и сигнальных белков, включая компоненты сигнальных путей FAK¹, SRC², AKT³ и ERK⁴ [121,122]. Эти сигнальные пути обеспечивают регуляцию множества процессов, таких как ингибирование гибели клеток, регуляция динамики цитоскелета, поддержание полярности клеток, внутриклеточный транспорт, миграция клеток и межклеточная коммуникация [121]. Как активные, так и неактивные гетеродимеры интегрин постоянно эндоцитируются с поверхности клетки, при этом активные интегрины продолжают передавать сигналы из эндосом [123]. Эндоцитированные интегрины могут быть возвращены обратно в цитоплазматическую мембрану и участвовать в образовании новых участков адгезии [124] или подвергаться лизосомальной деградации [125].

Поскольку интегрины соединяют цитоскелет клетки с ВКМ, они постоянно подвергаются воздействию механических сил. Интегрины принято считать одними из основных механочувствительных рецепторов [126,127]. Способность интегринов быть одновременно и рецептором, и передатчиком механических

¹ Киназа фокальной адгезии (от англ. focal adhesion kinase)

² Рецепторная тирозинкиназа семейства Src (от сокр. англ. sarcoma)

³ Серин-трионинкиназа В (от англ. A_k strain transforming)

⁴ Киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (от англ. extracellular signal-regulated kinase)

сигналов обусловлена тем, что приложенная к макромолекулам сила влияет на их конформацию и функционирование [128]. Такая механическая регуляция может влиять на три фундаментальных свойства интегрин: кинетику связывания лиганда, конформацию и активацию, а также латеральную диффузию в мембране и кластеризацию. Приложение к интегринам механического усилия приводит, как правило, к созреванию и упрочнению адгезивного контакта [129]. Процесс созревания контакта является сложным и может привести к образованию различных типов комплекса интегрин-матрикс, отличающихся по размеру, форме и молекулярному составу [33]. Одновременно с этим, связанные с контактом актиновые волокна выстраиваются в направлении приложения силы [130,131].

Созревание интегриновых контактов при механической нагрузке влияет на последующие реакции клеток. Во-первых, созревание контактов включает привлечение и активацию сигнальных белков, таких как FAK [132], паксиллин [133], SRC [134] и ERK [135]. Зрелые фокальные контакты индуцируют усиленную полимеризацию актина и образование актиновых стресс-волокон, что приводит к эффектам двух типов. Во-первых, полимеризация актина непосредственно влияет на ядерную локализацию и функцию механочувствительных регуляторов транскрипции, таких как MRTF α ⁵ [136] или YAP⁶/TAZ⁷ [137]. Во-вторых, стрессовые волокна механически соединяют комплекс интегрин-ВКМ с ядром через белковый комплекс, получивший название линкера ядерного скелета и цитоскелета (LINC⁸) [138], обеспечивая прямую передачу механического напряжения от матрикса к ядру. Это приводит к ряду эффектов, включая изменения в структуре ядерных пор, способствующие ядерному импорту YAP/TAZ [139], ремоделирование хроматина [140],

⁵ Миокардин-ассоциированный транскрипционный фактор (от англ. myocardin-related transcription factor)

⁶ Yes-ассоциированный белок (от англ. Yes-associated protein)

⁷ Транскрипционный ко-активатор с PDZ-связывающим мотивом (от англ. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)

⁸ Линкер ядерного скелета и цитоскелета (от англ. linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)

изменения в конформации, доступности и фосфорилировании ряда ядерных белков [141-143].

Поскольку жёсткость является пассивным механическим параметром, клетки не могут получить информацию о ней напрямую. Чтобы измерить жесткость окружающей среды, клеткам необходимо приложить усилие и зарегистрировать ответ [105]. Таким образом, клетки определяют жесткость ВКМ косвенно, при этом интегриновые контакты, связывающие цитоскелет и ВКМ, являются ключевым элементом, определяющим передачу силы [105]. Способность интегрин к передаче механического напряжения (наряду с некоторыми другими параметрами, такими как сократительная способность миозина) контролируют механочувствительность клетки и определяют необходимый для протекания физиологически нормальных процессов диапазон жесткости матрикса [144]. Различная жесткость матрикса влияет на динамику передачи усилия в комплексе, состоящем из актина, интегрин и ВКМ [145]. Передача динамической силы через интегрины и ассоциированные с ними белки происходит даже на наноуровне, поскольку было показано, что сократительные единицы актомиозина в масштабе 100 нм (что соответствует размеру зарождающегося фокального контакта), связанные с ВКМ с помощью интегринов, могут определять жесткость субстрата и реагируют на нее, запуская синтез белка цитоскелета α -актина [146,147]. Помимо объемной жесткости, интегрин опосредованная реакция клетки будет варьировать в зависимости от того, ведет ли матрикс себя как чисто эластичный материал или имеет более выраженные вязкоупругие характеристики [148,149].

1.3.2 Дискордин-доменные рецепторы

Наряду с рецепторами из класса интегринов, в восприятии клеткой механических свойств матрикса значительную роль играют дискордин-доменные рецепторы. Семейство дискордин-доменных рецепторов (DDR⁹)

⁹ Дискордин-доменные рецепторы (от англ. discoidin domain receptor)

включает двух представителей: DDR1 и DDR2, которые являются рецепторными тирозинкиназами [150]. Лигандом этих рецепторов является коллаген, что достаточно необычно для тирозинкиназ [151]. При связывании с коллагеном DDR подвергаются аутофосфорилированию, что приводит к активации нижележащих сигнальных каскадов и, соответственно, изменению поведения клетки.

Подсемейство DDR1 состоит из пяти изоформ, образуемых путем альтернативного сплайсинга. DDR1a, DDR1b и DDR1c являются полноразмерными функциональными рецепторами, а DDR1d и DDR1e являются усеченными или киназонеактивными рецепторами. Подсемейство DDR2 представлено одним белком [152]. Все DDR представляют собой трансмембранные гликопротеины однопроходного типа I, которые состоят из шести различных белковых доменов. Предполагают, что разные домены отвечают за распознавание разных фибриллярных и нефибриллярных участков коллагена [153].

Как DDR1, так и DDR2 связываются с фибриллярными коллагенами I–III и V и активируются ими. Коллаген IV базальной мембраны активирует DDR1, но не DDR2 [151], тогда как нефибриллярный коллаген X в первую очередь активирует DDR2 [154]. DDR связываются с нативной тройной спиралью коллагенов, а не с отдельными α -цепями или денатурированными коллагенами, возникающими при ремоделировании матрикса [155]. Аналогично, дегликозилированный или деградированный коллаген не может поддерживать активацию DDR [156]. Также вероятно, что на взаимодействие DDR и коллагена могут влиять факторы постфибриллогенеза, такие как минерализация матрикса, гликирование и сшивка. Хотя DDR сохраняют способность связываться как с мономерным [157], так и с полимеризованным [158] коллагеном I, активация DDR2 в клетках, культивируемых на мономерном коллагене, ниже, чем в клетках, культивируемых на полимеризованном коллагене [159]. Таким образом,

структурные изменения коллагена при ремоделировании ВКМ, могут изменять передачу сигналов с участием DDR.

Двумя отличительными чертами динамики фосфорилирования DDR являются отсроченный и устойчивый ответ. Было показано, что классические тирозинкиназы, такие как рецептор EGF¹⁰ и рецептор FGF¹¹, подвергаются аутофосфорилированию в течение нескольких секунд после связывания с лигандом [160]. DDR же для достижения аналогичного активированного состояния необходим длительный период (от минут до часов) [151]. После активации рецептора многие классические тирозинкиназы подвергаются негативной регуляции с помощью таких механизмов, как интернализация рецептора/лиганда и последующая деградация или дефосфорилирование фосфатазами [161]. Однако в случае DDR уровень фосфорилирования сохраняется в течение нескольких дней без каких-либо видимых механизмов для ослабления сигнала [151].

Одна из версий, объясняющих особенности кинетики активации DDR1, предполагает, что это может быть связано с взаимодействием сигналов, активируемых DDR и интегринами. Поскольку активация интегрин и образование сигнальных комплексов фокальной адгезии происходят в течение нескольких минут после связывания коллагена, вполне вероятно, что DDR эволюционировали как механизм поздней волны отрицательной обратной связи. Это подтверждается способностью DDR1 противодействовать сигнальным эффектам интегрин путем уменьшения активации STAT1/3¹² и Cdc42¹³ [162,163]. Такой ответ может быть необходим для облегчения перехода в новое клеточное состояние [164]. Однако такая версия поднимает вопрос об отсутствии отрицательной регуляции самого рецептора DDR.

¹⁰ Эпидермальный фактор роста (от англ. epidermal growth factor)

¹¹ Фактор роста фибробластов (от англ. fibroblast growth factor)

¹² Фактор, передающий сигнал и активирующий транскрипцию (от англ. signal transducer and activator of transcription)

¹³ Белок контроля клеточного деления (от англ. cell division control protein)

Возможно, одна из функций длительно поддерживаемого фосфорилированного состояния DDR заключается в удержании высокой локальной концентрации адапторных и сигнальных белков, таких как Shc¹⁴ и PI3K¹⁵, в непосредственной близости от классических тирозинкиназ [165]. Как только уровни фосфорилирования этих классических рецепторных тирозинкиназ снижаются в результате срабатывания механизмов отрицательной обратной связи, белки-адаптеры могут затем вернуться к все еще активированным DDR, поддерживая уровень белка в стабильном состоянии.

В отличие от факторов роста, которые обычно секретируются аутокринным или паракринным образом в ответ на раздражители, коллаген является относительно стабильным и распространенным лигандом. Таким образом, медленная скорость активации DDR может представлять собой эволюционный механизм, позволяющий избежать быстрой и чрезмерной активации рецептора в присутствии окружающего клетку коллагена до тех пор, пока не будет достигнут порог концентрации лиганда или времени воздействия. Внутриклеточные механизмы также имеют значение, поскольку DDR1 гиперфосфорилируется в присутствии перванадата, что позволяет предположить, что медленная динамика фосфорилирования DDR обусловлена, по крайней мере частично, регуляцией тирозинфосфатазами [166].

Количество DDR1 на поверхности клетки, согласно имеющимся данным, также регулируется отщеплением эктодомена, опосредуемым действием металлопротеаз [167,168]. Высвобожденный эктодомен может изменять организацию расположенного поблизости матрикса. Было показано, что как закрепленный на мембране DDR1, так и его эктодомен ингибируют фибрилlogenез, снижая скорость и количество синтеза коллагена I и изменяя морфологию волокон и минерализацию матрикса [169].

¹⁴ Трансформирующий Src содержащий белок (от англ. Src homology 2 domain containing transforming protein)

¹⁵ Фосфоинозитид-3-киназа (от англ. phosphoinositide 3-kinases)

Активация DDR при связывании с коллагеном приводит к аутофосфорилированию внутриклеточных доменов димера и образованию сайтов связывания для белков, содержащих домены SH2¹⁶, SH3 и РТВ¹⁷ [170,171] с последующей активацией каскадов PI3K/Akt и Ras/ERK MAPK¹⁸ [172,173]. В настоящее время установлены не все аспекты передачи сигнала при коллаген-опосредованной активации DDR. Во-первых, DDR связываются с несколькими типами коллагена, которые проявляют как уникальные, так и общие структурные и биологические свойства, и, следовательно, разные типы коллагена могут вызывать разные реакции рецепторов [174]. Во-вторых, коллагены могут быть связаны большим количеством других рецепторных белков (например, интегринами), что приводит к пересечению сигнальных каскадов и трудностям однозначной идентификации инициатора сигнального каскада [175]. В-третьих, передача сигналов посредством DDR зависит от типа клетки/ткани, а также от контекста микроокружения [172,173]. В-четвертых, DDR могут действовать совместно с другими сигнальными рецепторами, включая рецепторы Wnt5a¹⁹/Frizzled²⁰ [176,177] и рецептор инсулина [178]. Схема DDR-опосредованных сигнальных путей приведена на рисунке 3.

¹⁶ Гомолог Src (от англ. Src homology)

¹⁷ Фосфотирозин-связывающий домен (от англ. phosphotyrosine-binding domain)

¹⁸ Митоген-активируемая протеинкиназа (от англ. mitogen-activated protein kinases)

¹⁹ Сигнальный путь Wnt — один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей (от англ. wingless-int)

²⁰ Семейство атипичных рецепторов, связанных с G-белком

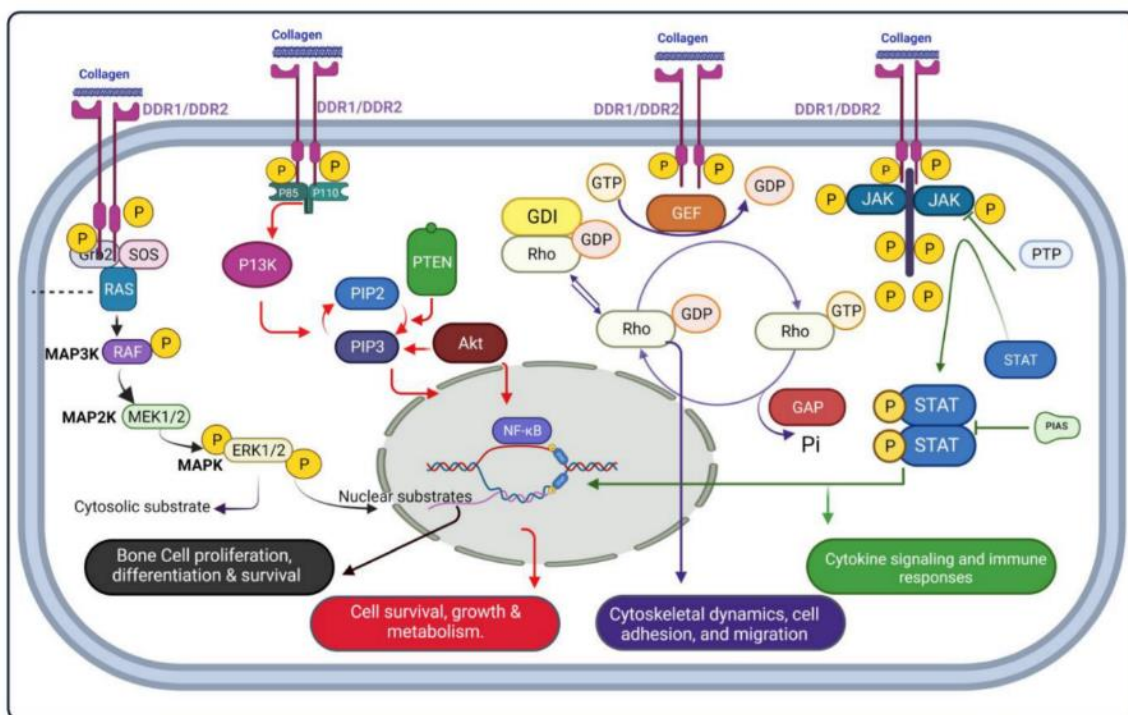


Рис 3. Упрощённая схема DDR-опосредованных сигнальных путей [179]

DDR, как один из важнейших механорецепторов, распознаёт механические свойства коллагена, что приводит к активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов. Связывание с коллагеном вызывает кластеризацию DDR, что является необходимым условием для высокоаффинного связывания и последующей активации рецептора [180,181]. Эта кластеризация также поддерживается актомиозиновым комплексом со стороны клетки, что позволяет передавать механическое напряжение не только посредством активации биохимических каскадов, но и за счёт прямого изменения структуры цитоскелета [182]. Жесткость коллагена определяет степень активации DDR и последующие клеточные реакции. В более жестких коллагеновых матриксах активация DDR, как правило, более выражена, что способствует усилению нисходящей передачи сигналов [182]. Запуск сигнальных каскадов, в свою очередь, оказывает влияние на такие процессы жизнедеятельности клетки, как адгезия [183,184], миграция [185], а также участие в ремоделировании матрикса [186]. Модификация

цитоскелета в ответ на изменение жёсткости матрикса приводит к увеличению напряжения сдвига на мембране клеток, что также способствует кластеризации DDR и, соответственно, усиливает его активацию [152]. Таким образом, увеличение жёсткости может приводить к активации петли обратной связи с поддержанием высокого уровня активного DDR на поверхности клетки [182]. Это подчеркивает сложное взаимодействие между механическими свойствами коллагена, работой цитоскелета и DDR опосредованными сигнальными путями.

1.3.3. Роль рецепторов Notch в механотрансдукции

Notch — рецептор межклеточного взаимодействия, являющийся ключевым компонентом одноимённого сигнального пути, регулирующего ключевые триггеры клеточного развития во многих биологических процессах, таких как пролиферация, дифференцировка, поддержание гомеостаза. Дисрегуляция данного сигнального пути ассоциирована с целым рядом заболеваний, включая онкологические. Важной особенностью сигнального пути Notch является способность оказывать различный эффект в зависимости от биологического контекста [187]. Сигнальный путь Notch инициируется взаимодействием между соседними клетками, которые экспрессируют трансмембранные лиганды (Jagged 1, 2 и Dll²¹ 1, 3, 4) и рецепторы (Notch 1–4) [188]. Результатом взаимодействия рецептора Notch с лигандом становится высвобождение его внутриклеточного домена (NICD), который транслоцируется в ядро и выступает в роли транскрипционного фактора [189]. В этом случае Notch рецептор является трансмембранным передатчиком, способным напрямую переводить внешний стимул в транскрипционный ответ без необходимости использования ферментативного усиления сигнала, в связи с чем даже небольшие изменения в количестве NICD могут приводить к значительному клеточному ответу [190]. Транскрипционный ответ Notch регулируется как за счёт концентрации NICD, так и за счёт времени его свободного нахождения в клетке [191]. Например,

²¹ Дельта-подобные лиганды (от англ. delta-like)

различные лиганды могут генерировать сигналы NICD с разными характерными временами, что может селективно регулировать разные таргетные гены [192].

Всё больше исследователей сходится во мнении, что сигнальный путь Notch подвержен механорегуляции и участвует в ней [193]. Notch не только работает совместно с другими механизмами передачи механических сигналов, но также напрямую зависит от физических сил, приложенных в момент его активации [194]. Ряд исследователей предполагают, что именно механические сигналы влияют на то, как сигнал Notch, создаваемый на мембране, передается в ядро и преобразуется в транскрипционный ответ [195]. Как говорилось ранее, Notch — это контакт-опосредуемый путь, который задействует две соседние клетки, экспрессирующие различные компоненты сигнального пути. Полноразмерный рецептор Notch (NFL) синтезируется в виде отдельного полипептида и модифицируется углеводными группами в эндоплазматическом ретикулуме [17]. В аппарате Гольджи рецептор дополнительно модифицируется периферическими гликозилтрансферазами и проходит свое первое расщепление, S1, катализируемое фуриноподобной конвертазой, с образованием двух фрагментов: трансмембранно-внутриклеточного домена Notch (NTM) и внеклеточного домена Notch (NECD) [196]. Когда рецептор на мембране одной клетки взаимодействует с лигандом на мембране другой клетки, он подвергается механическому воздействию, который приводит к двум последовательным протеолитическим расщеплениям (S2 и S3) внутриклеточного домена [197]. Эти расщепления вызываются металлпротеазой ADAM и γ -секретазным комплексом, что приводит к образованию усечённого внеклеточного домена Notch (NEXT) и высвобождению NICD [198]. Внутриклеточный домен NICD, в свою очередь, перемещается в ядро клетки, где он взаимодействует с CSL (CBF1, супрессор Hairless, Lag-1) и другими транскрипционными факторами, что активирует транскрипцию таргетных генов [199]. В лиганд-презентирующей клетке после взаимодействия лиганд подвергается эндоцитозу совместно с внеклеточным

доменом рецептора и либо используется для дальнейшего участия в сигнальном пути, либо подвергается протеосомной деградации [200].

К настоящему времени накоплены данные, подтверждающие, что участие сигнального пути Notch в различных биологических процессах напрямую связано с механическим стрессом [192]. Показано, что напряжение сдвига является важным фактором, определяющим локализацию рецепторов Notch и настраивающим сигнальную активность Notch. Так, например, в клетках эндотелия сосудов напряжение сдвига запускает Dll4-опосредованное протеолитическое расщепление Notch1, высвобождая трансмембранный домен, который регулирует межклеточные адгезионные контакты неканоническим, независимым от транскрипции способом [201]. Напряжение сдвига усиливает экспрессию, внутриклеточную реорганизацию и способность к активации Jagged1 в клетках гладкой мускулатуры сосудов, что является важным фактором при ремоделировании сосудистой сети [202]. С другой стороны, низкий колебательный сдвиг усиливает передачу сигналов между Jagged1 и Notch4 в эндотелии и способствует развитию атеросклероза [203,204]. Было также показано, что активность Dll1 и Dll4 усиливается напряжением сдвига что приводит к модуляции ангиогенеза [205].

Несмотря на то, что реакция на напряжение сдвига по всей видимости является общей для семейства рецепторов Notch, конкретные механизмы и клеточный ответ различаются, что, вероятно, связано с величиной напряжения сдвига и его типом [206]. Недавно было показано, что колебательное напряжение сдвига индуцирует ядерную локализацию Notch 3, но не Notch1 или Notch2, в эндотелии сосудов во время эпителиально-мезенхимального перехода [207].

Точный механизм действия механических сил во время взаимодействия рецептор-лиганд еще предстоит выяснить, тем не менее, полученные данные указывают на взаимодействия на мембранном уровне как на возможный объект механорегуляции. Например, лиганды Dll4 и Jagged1 формируют связи с Notch1,

аффинность которых усиливается при приложенном растяжении, несмотря на относительно низкое начальное сродство к рецептору Notch1 [208-210]. Разные лиганды имеют разное сродство к Notch1 и разные пороги необходимого механического воздействия для его активации [211]. Компоненты Notch также могут взаимодействовать с протеогликанами гликокаликса, в частности, синдеканами, одними из самых ранних идентифицированных механочувствительных комплексов [212,213]. Чтобы активировать рецептор, лиганды Notch должны быть привязаны к мембране. В условиях *in vitro* было показано, что иммобилизация лиганда на субстрате может приводить к активации рецептора [214]. Аналогичным образом, ограничение латеральной диффузии рекомбинантного Dll4 на мембранах приводит к повышению активности Notch [215]. Растворимые лиганды также могут связывать рецепторы, но, за редким исключением, проявляют ингибирующий эффект на передачу сигналов Notch [216,217]. Необходимость в закреплении лигандов на мембране связана с самоингибирующей конформацией внеклеточного фрагмента Notch, поскольку участок расщепления S2 прикрыт от металлопротеаз так называемой негативной регуляторной областью белка (NRR) [193]. Таким образом, лиганд должен механически потянуть за собой рецептор, чтобы развернуть NRR и освободить сайт расщепления. Благодаря этой особенности Notch можно считать опосредованным механорецептором. Модифицируя NRR, можно увеличить порог воздействия и сделать рецептор невосприимчивым к лиганд-опосредованной активации [218]. В стандартных условиях, при приложении механического усилия к N-концу рецептора Notch и связанному с ним в качестве лиганда бензилгуанину, достаточно усилия в 9 пН, чтобы активировать рецептор Notch [219]. Точный механизм того, как инициируется натяжение комплекса «рецептор-лиганд», остается неясным.

Стоит отметить, что жесткость субстрата обратно коррелирует с трансэндоцитозом NECD клеткой с лигандом, но не с общим эндоцитозом, что

указывает на дополнительный уровень механорегуляции. Этот процесс играет важную роль для обеих клеток: в клетке с лигандом он стимулирует убиквитилирование лиганда и рекрутирование эпсинов, необходимых для изменения конформации мембраны, а в клетке с рецептором сопротивление эндоцитозу лиганда приводит к изменению конформации Notch, обеспечивая его активацию [220]. Кроме этого, эндоцитоз рецептора клеткой, принимающей сигнал, также может воздействовать на связанный комплекс «рецептор-лиганд» и изменять тип сигнала [221].

По всей видимости, существуют и другие механизмы, вовлечённые в создание силы натяжения. Так, показано, что лиганд Jagged1 взаимодействует с белком промежуточных филаментов виментином [222]. Закрепление на цитоскелете, возможно, может ограничивать латеральную диффузию лиганда и даже стимулировать изменение конформации клеточной мембраны через комплекс «рецептор-лиганд», приводя к увеличению напряжения. Такие особенности согласуются с тем, что для активации Notch1 его комплекс с Jagged1 требует более высокого напряжения путём растяжения, чем комплекс с лигандом Dll4 [208]. Рецептор Notch также может регулироваться путем ограничения латеральной диффузии и сцепление с цитоскелетом, которые могут преобразовывать клеточные микродвижения в тянущие силы. В целом, эти механизмы могут влиять на особенности передачи сигналов Notch в различном контексте с учетом состояния цитоскелета и действующих механических факторов, таких как жесткость внеклеточного матрикса, напряжение сдвига и деформация [13,223].

Как было показано в ряде исследований, белки, участвующие в протеолитическом расщеплении Notch и прерывании сигнала, также напрямую связаны с механотрансдукционными сигнальными путями [224,225]. Участвующая в расщеплении и активации Notch металлопротеаза ADAM регулируется прямым механорецептором Piezo1, который таким образом

опосредованно регулирует передачу сигнала Notch [226]. Ещё один этап протеолиза Notch осуществляется протеазным комплексом γ -секретазы. Активация этого комплекса зависит от интегрин-связанной киназы (ILK), регулируемой интегринами в ответ на механические стимулы от внеклеточного матрикса [227,228]. Недавно было показано, что рекрутирование γ -секретазы, взаимодействие «лиганд-рецептор» и протеолитическое расщепление Notch пространственно и механически регулируются адгезивными соединениями в мембранных микродоменах [229].

Исследования механорегуляции сигнального пути Notch в основном сфокусированы на событиях до высвобождения NICD. На следующих этапах NICD должен пройти через ядерную мембрану, сформировать комплекс с дополнительными белками и обеспечить активацию транскрипции целевых генов путем взаимодействия с гетерохроматином [230]. Всё больше работ подтверждают факт, что именно ядро клетки является основным центром передачи и интерпретации механических сигналов. Механический стресс индуцирует изменения архитектуры ядерной оболочки и ядерных пор, что приводит к изменению доступности эпигенетических меток и возможности взаимодействия с гетерохроматином [191,231]. Таким образом, можно сделать вывод, что механорегуляция сигнального пути Notch осуществляется на всех этапах его работы.

1.4 Роль структурно-механических свойств внеклеточного матрикса в регуляции процессов клеточной миграции и дифференцировки

Свойства клеточного окружения, в частности его структура и биомеханика, играют ключевую роль в регуляции клеточных процессов, включая метаболизм, транскрипцию генов и эпигенетические механизмы. Эти изменения влияют на различные аспекты клеточной активности, такие как миграция, дифференцировка и индукция клеточной гибели. Кроме того, реакция клеток на

механические свойства окружающей среды может различаться в зависимости от их типа и происхождения. Не менее важно и влияние матрикса на деление клеток. В 2D-условиях повышение жёсткости обычно способствует пролиферативной активности [232], в то время как в 3D-условиях жёсткость матрикса и малый размер пор наоборот могут угнетать клеточный цикл [233].

1.4.1 Адгезия и распластывание клеток

При взаимодействии с матриксом или его искусственным заменителем, клетки распластываются по поверхности волокон, принимая различные формы — сферические, веретёнообразные или неопределённой формы, с различными выростами в виде ламеллоподий, филлоподий или инвадоподий [106]. В 2D-условиях, увеличение жёсткости субстрата обычно приводит к уплощению клеток [234]. В 3D-условиях, аналогичное распластывание возможно только в достаточно жёстких матриксах с подходящим размером пор, при этом уменьшение размера пор снижает возможность клеток к распластыванию [235]. Аналогичный эффект наблюдается при увеличении количества ковалентных сшивок как в искусственных, так и в ферментативно модифицированных естественных матриксах [236,237]. С другой стороны, вязкоупругие гели с достаточной релаксацией напряжения или высокой пластичностью, или же разрушающиеся за счёт протеазной или гидролитической активности, упрощают процесс распластывания для клеток [238-240].

Несмотря на то, что для нормального процесса прикрепления к субстрату и распластыванию требуется лиганд-рецепторное взаимодействие (например, взаимодействие интегринов или коллагеном), избыточное количество рецепторов к матриксу на поверхности клетки или же общего числа образовавшихся между клеткой и матриксом контактов в случае большого диаметра волокна также может приводить к усложнению распластывания клеток [241]. Также на этот процесс активно влияют и другие параметры ВКМ, например, его геометрия [242] и кривизна волокон [243], что приводит к

перераспределению белков адгезии на поверхности клетки и, соответственно, влияет на адгезию и распластывание [244].

1.4.2 Влияние механических свойств матрикса на клеточную миграцию

Клетки мигрируют в тканях организма во время развития организма, заживления повреждений, при перемещении иммунных клеток, а также при метастазировании опухолевых клеток [245]. При этом механические свойства среды могут существенно влиять на этот процесс. Для клеток разного происхождения показана зависимость скорости миграции от жёсткости субстрата, в также способность мигрировать вдоль градиента жёсткости. Последнее явление получило название дуротаксиса [246]. Так, например, показано, что скорость передвижения фибробластов на более жёстком 2D-субстрате выше, чем на мягком [247], при этом фибробластам сложно мигрировать из области мягкого матрикса в область жёсткого [248]. В отношении гладкомышечных клеток и эпителиальных клеток почки показана двухфазная зависимость и наличие области оптимума с уменьшением скорости миграции клеток как при большей, так и при меньшей жёсткости [249,250].

Мультиклеточные кластеры из эпителиальных клеток могут быть способны к дуротаксису, даже если одиночные клетки не обладают такой способностью. Мягкий матрикс, по-видимому, способен стимулировать коллективную однонаправленную миграцию эпителиальных клеток. В то же время, в колониях клеток на жёстком матриксе отмечается разнонаправленное движение [251]. Предполагают, что механизм коллективной миграции активируется при повреждениях эпителия, для которых характерно сочетание отсутствия контактного ингибирования и низкая жёсткость матрикса, и обеспечивает протекание естественной регенерации,

В трёхмерных условиях на миграцию клеток помимо жёсткости субстрата оказывают влияние и другие факторы, включая пористость и размер пор. Так, например, при размере пор от 3 мкм клетки передвигаются просто за счёт

протискивания сквозь поры [252,253], при этом направление миграции регулируется взаимным расположением матричных волокон и общей архитектурой матрикса [254]. В матриксах с меньшим размером пор, клеткам приходится прокладывать себе путь для миграции за счёт секреции внеклеточных протеаз [255] или раздвигая волокна мягких матриксов и создавая себе временную пору [256,257]. Кроме того, как положительный, так и отрицательный эффект на миграцию клеток может оказывать давление интерстициальной жидкости [258].

1.4.3 Роль матрикса в дифференцировке стволовых клеток

Один из важнейших механизмов участия матрикса в поддержании структуры и функционирования ткани реализуется путем влияния на пул стволовых клеток [259]. Ранние работы на 2D-культурах показали, что жёсткость субстрата регулирует направление дифференцировки стволовых клеток и подкрепили гипотезу о том, что нахождение стволовых клеток в среде с нативной для определённой ткани жёсткостью будет стимулировать клетки дифференцироваться по этому тканеспецифичному пути [106,260]. Например, выращивание культуры мезенхимальных стволовых клеток на подложке с жёсткостью, характерной для кости, способствовало остеогенной дифференцировке [106], в то время как рост на мягком субстрате стимулировал клетки к развитию по адипогенному пути [261,262]. В случае более дифференцированных клеток, например стволовых клеток поперечно-полосатой мускулатуры, рост на субстрате с нативной жёсткостью приводит к активации процессов самообновления и увеличения клеточного пула [263]. На дифференцировку также влияет количество и расположение рецепторов к компонентам матрикса и, соответственно, геометрия матрикса, от которой зависит сколько рецепторов будет иметь возможность провзаимодействовать с матриксом [264-266].

Похожие закономерности влияния биомеханических свойств матрикса на дифференцировку клеток были обнаружены и в 3D-условиях; в этом случае, по мнению большинства исследователей, главную роль играют вязкоупругость матрикса и его способность к деградации [267-269]. Аналогично 2D-условиям, в мягких матриксах мезенхимальные стволовые клетки дифференцируются в адипоциты, а в жёстких — идут по остеогенному пути развития [237,270]. Кроме того, матриксы с высокой степенью релаксации могут стимулировать остеогенез [268]. Предполагают, что архитектурные особенности ВКМ, такие как диаметр волокон и их взаимное расположение, также могут влиять на дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [244]. В ряде исследований показано, что в 3D-условиях механические сигналы влияют на судьбу и других популяций стволовых клеток, а также на дифференцировку моноцитов [32,271,272].

1.4.4 Влияние структуры и механических свойств матрикса на морфогенез

Морфогенез — это сложный многоклеточный процесс, при котором клетки самоорганизуются, образуя трехмерные структуры со специализированной формой и функциями [273]. Несмотря на то, что основой для морфогенеза являются именно коллективные клеточные взаимодействия, всё больше исследований подчёркивают вклад трёхмерного микроокружения в обеспечение корректного протекания нормального развития и функционирования ткани [274,275]. Например, наличие большого количества волокон коллагена, который может быть разрушен характерными для нормальных клеток металлопротеазами способствует апикально-базальной поляризации, нарушая симметрию, что поддерживает жизнеспособность пула клеток кишечника разной стадии дифференцировки [276,277]. Аналогичные условия также не позволяют развиваться прогениторным клеткам нейральной трубки [278]. Немаловажными факторами регуляции морфогенеза, как и других, описанных выше клеточных процессов, являются жёсткость матриксных волокон, и их пространственное

распределение [243]. Так, например, недавно было показано, что с геометрией ВКМ связано формирование нормальных структур кишечника, а от жёсткости матрикса зависит выживаемость клеток кишечника и их пролиферативная активность [279,280]. Кроме того, на примере органоида из гепатоцитов было показано, что нормальное формирование структур печени также зависит от жёсткости матрикса, а именно от её сходства с характеристиками матрикса нативной ткани [281].

Следует отметить, что клетки не только разрушают матрикс в процессе своей жизнедеятельности, но также заново синтезируют его компоненты [282]. В частности, при развитии хрящевой ткани изначальные вязкоупругие свойства матрикса регулируют синтез матриксных волокон хондроцитами и мезенхимальными стволовыми клетками [283,284]. При нахождении в искусственном геле или в легко деградируемом матриксе клетки ремоделируют матрикс в более сшитый хрящеподобный матрикс [285]. В целом, клетки реагируют на изменение биомеханических свойств среды путём секреции или разрушения ряда эндогенных компонентов ВКМ. Такой механизм обратной связи позволяет тонко настраивать взаимодействия клетки и матрикса [3,101].

1.5 Роль матрикса в процессе канцерогенеза и развития опухолей

Роль ВКМ в процессе канцерогенеза и развития опухолей является предметом все более интенсивного исследования в современной онкологии. Одной из доминирующих на данный момент теорий развития опухоли считается теория поля тканевой организации (англ. The tissue organization field theory, TOFT), которая предполагает, что несбалансированные изменения в микроокружении клеток, включая ВКМ, могут играть определяющую роль в процессе канцерогенеза [286,287]. На первых этапах канцерогенеза ВКМ участвует в регуляции клеточных сигнальных путей, способствующих выживанию и пролиферации трансформирующихся клеток. В этом контексте

внеклеточный матрикс может выступать в качестве платформы для взаимодействия клеток и регуляторных молекул, что способствует обеспечению оптимальных условий для прогрессирования опухолевого роста. Далее, на этапе инвазии и метастазирования, ВКМ предоставляет опухолевым клеткам подходящие условия для миграции в окружающие ткани, а также для формирования новых очагов роста в дистантных органах [287,288].

1.5.1 Инициация канцерогенеза

Как нормальные, так и опухолевые клетки реагируют на жёсткость ВКМ, изменяя свой фенотип, что отражается в изменениях метаболического и пролиферативного профилей. Показано, что большая часть эффектов влияния жёсткости матрикса на поведение клеток выражается в изменении пролиферативной активности, а также может приводить к усилению миграционных способностей клеток и инициировать или усилить опухолевую трансформацию [289,290]. Так, например, эпителиальные клетки молочной железы в мягких матриксах способны к нормальному эпителиальному тубулогенезу, за счёт сохранения классической апикобазальной морфологии, однако в жестких матриксах им присуща аномальная морфология, характерная для опухолевых тканей, что не позволяет им формировать нативные для их резидентной ткани структуры [291]. Положение клеток относительно матрикса также играет важную роль. При заселении клеток эпителия молочной железы на двумерный жесткий субстрат, на котором клетки могут контактировать с подложкой только с одной стороны, было показано, что клетки приобретают большую пролиферативную активность, аналогичную опухолевой, за счёт отключения механизма контактного ингибирования, хотя формирования характерных для опухоли структур при этом не наблюдалось [11]. В другом исследовании было показано, что при росте сфероидов из клеток молочной железы в трёхмерном матриксе с динамическим переходом жесткости от мягкого к жесткому, клетки, мигрировавшие из сфероида по матриксу, проходили через

весь спектр морфологических изменений от нормального эпителиального до мезенхимального. Такое изменение фенотипа отражает характерный для трансформированных клеток эпителиально-мезенхимальный переход [292]. Предполагают, что жесткий матрикс может индуцировать онкогенный фенотип посредством изменений состояния хроматина за счёт увеличения напряжения мембран клеток и сопутствующей реструктуризации цитоскелета, приводящей к изменению формы ядра и активации ряда сигнальных каскадов [293].

Изменение жесткости матрикса регулирует частоту возникновения опухолей во взаимодействии с другими факторами. Так, известно, что трансформирующий фактор роста бета (TGF β) выполняет две противоположные функции при прогрессировании рака: функцию супрессора опухоли путем ингибирования пролиферации и индуцирования апоптоза, а также функцию индуктора опухоли путем активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и увеличения миграции клеток. В 2D-условиях у нормальных клеток молочной железы и эпителиальных клеток почек на мягком матриксе TGF β индуцирует апоптоз; с другой стороны, на жестком матриксе TGF β приводит к индукции ЭМП [294]. Эти исследования показывают, что жесткость матрикса и другие факторы регулируют инициацию опухоли скоординированным образом.

1.5.2 Влияние механических свойств матрикса на пролиферацию опухолевых клеток

При образовании опухолей малигнизированные клетки активно делятся и образуют кластеры. Также как и нормальные клетки, опухолевые клетки реагируют на жесткость матрикса и способны соответствующим образом изменять свою пролиферативную активность. Для 2D-условий показано, что жесткий матрикс усиливает пролиферативную способность клеток при гепатоцеллюлярной карциноме [295], колоректальном раке [296], раке легких [297], раке поджелудочной железы [298]. Пролiferация опухолевых клеток также косвенно связана с жесткостью матрикса за счёт стимуляции

пролиферации опухоль-ассоциированных стромальных клеток. В частности, показано, что мезенхимальные стволовые клетки, дифференцированные в опухоль-ассоциированные фибробласты на жестком матриксе, секретируют растворимый фактор прозапозин, который способствует пролиферации клеток рака молочной железы [299]. Кроме того, жесткий матрикс индуцирует аутофагию в стромальных клетках, таких как фибробласты и звездчатые клетки, что усиливает рост соседних опухолевых клеток [300]. Таким образом, жесткость матрикса может оказывать влияние на пролиферацию опухолевых клеток как за счёт прямых, так и за счёт косвенных механизмов.

Следует, однако, отметить, что в 3D условиях влияние жёсткости на пролиферацию опухолевых клеток не так однозначно. Например, эксперименты с использованием геля на основе коллагена и полиэтиленгликоля показали, что клетки рака молочной железы демонстрируют более высокую скорость роста и выраженную мезенхимальную морфологию в мягких гелях по сравнению с двумерными моделями [301,302]. В других же работах взаимосвязи между жёсткостью трёхмерного субстрата и скоростью роста опухолевых клеток выявлено не было [24]. Таким образом, можно сделать вывод, что на данный момент знания о влиянии жёсткости матрикса на пролиферацию клеток в 3D условиях являются разрозненными, зачастую противоречивыми, и требуют дальнейшего изучения темы.

1.5.3 Миграция и инвазия опухолевых клеток в матриксах с разными биомеханическими свойствами

Биомеханические свойства матрикса также влияют на миграцию (перемещение клеток) и инвазию (внедрение клеток в окружающие ткани) опухолевых клеток, и, как следствие, на прогрессирование опухолей. Было продемонстрировано, что подвижность клеток положительно регулируется жёсткостью субстрата в 2D- и отрицательно — в 3D-условиях [303]. Увеличение подвижности опухолевых клеток в 2D-условиях с ростом жёсткости субстрата

может быть обусловлено сдвигом фенотипа в сторону более инвазивного, как это было показано для опухолевых клеток разного происхождения [304-307]. Чаще всего активация инвазивной активности является следствием индуцируемого в таких условиях ЭМП [306].

В 3D-условиях, по всей видимости, эффект, оказываемый на миграцию опухолевых клеток жёсткостью субстрата, может существенно модифицироваться под влиянием дополнительных факторов, таких как 3D-геометрия субстрата, а также взаимное расположение опухолевых и стромальных клеток [308]. Так, по результатам исследования, выполненного в 3D-условиях, инвазия клеток рака молочной железы линии MDA-MB-231 в жёстком коллагеновом гидрогеле оказалась более медленной, чем в мягком [309]. Кроме того, было показано, что в 3D-матриксе формирование и функционирование инвадоподий для инвазии могут быть ограничены локальной жёсткостью волокон [310].

Исследования показали, что жесткость тканей имеет важное значение для метастазирования опухолей. Этот процесс происходит в несколько этапов: локальная инвазия опухолевых клеток в окружающие ткани, проникновение опухолевых клеток в кровеносные или лимфатические сосуды (интравазация), миграция клеток по сосудам, выход клеток из сосудов в отдаленные органы (экстравазация) и генерация вторичных опухолей путем роста в тканях [289]. Структура и биомеханические свойства матрикса влияют на каждый из этих шагов. В частности, показано, что увеличение жесткости тканей в первичных опухолях усиливает метастатический потенциал опухолевых клеток при гепатоцеллюлярной карциноме [308], раке легких [311] и раке молочной железы [301]. Жесткость матрикса влияет не только на опухолевые клетки, но и на нормальные клетки во время метастазирования. Например, клетки эндотелия сосудов увеличивают экспрессию разнообразных факторов на своей поверхности при нахождении на жёстком матриксе, что стимулирует опухолевые клетки к

интравазации [312]. Кроме того, повышение жесткости матрикса регулирует метаболический обмен между опухолевыми клетками и опухоль-ассоциированными фибробластами, что также усиливает их метастатический потенциал [313]. Решающее значение для метастазирования имеет не только жесткость матрикса первичной опухоли, но и жесткость матрикса в отдаленных тканях, однако сведения о направлении этого влияния противоречивы. С одной стороны, более жесткий матрикс способствовал образованию метастазов опухолей молочной железы в этих тканях [314]. С другой стороны, было показано, что повышение жесткости тканей может предотвращать метастазирование за счет стимуляции нормальных стромальных клеток, а именно, секреции прозапозина из опухоль-ассоциированных фибробластов [299]. Можно предположить, что влияние жесткости матрикса на миграцию и метастазирование опухолевых клеток может иметь разносторонний эффект в зависимости от контекста опухолевого микроокружения, а также генетических и фенотипических особенностей опухолевых клеток. Однако необходимо отметить, что механизмы такого влияния требуют дальнейшего изучения.

1.6 Использование децеллюляризованных внеклеточных матриксов в экспериментальной онкологии

Как было описано выше, ВКМ состоит из большого количества разнообразных молекул, причём состав и взаиморасположение этих молекул тканеспецифичны. Из-за этого практически невозможно искусственно имитировать нативный ВКМ, что ограничивает исследования в области взаимодействий «клетка-матрикс» [315]. При изучении этих взаимодействий важно помнить, что клетки нативной ткани увеличивают количество неконтролируемых факторов, что приводит к невозможности использования тканей или органов *ex vivo* для таких исследований [316,317]. Для решения этой проблемы можно использовать метод децеллюляризации. Децеллюляризация

(ДЦЛ) — это процесс элиминации клеточной компоненты из органа или ткани с максимальным сохранением структуры и химического состава ВКМ [318].

Наиболее важным аспектом при получении ДЦЛ матрикса является подбор протокола децеллюляризации, поскольку каждый метод по-своему влияет на состав и трёхмерную структуру матрикса [319,320]. К настоящему времени в связи с развитием регенеративной медицины было разработано большое количество разнообразных методов децеллюляризации, однако все их можно разделить на три основные группы: химические, физические и ферментативные [321].

В химических методах, наиболее часто используют такие вещества, как додецилсульфат натрия (SDS), дехоксихолат натрия (SDC) и Triton X-100 [322]. Эти детергенты солюбилизируют мембраны клеток, что позволяет получить матрикс с высокой степенью очистки от клеточного дебриса. Концентрация и длительность обработки детергентами требует оптимизации в зависимости от свойств ткани, так как при неправильном подборе протокола эти вещества могут изменять нативную структуру матрикса за счёт разрушения или изменения конформации белков [322]. Не менее часто используют кислоты и щёлочи в различной концентрации, поскольку они способны разрушать цитоплазматические компоненты клетки и нуклеиновые кислоты [323]. Однако, во многих работах отмечается, что использование кислот и щелочей способно привести к снижению содержания гликозаминогликанов, что может снижать нативные вязкоупругие свойства получаемого матрикса [324,325].

В качестве методов физической децеллюляризации чаще всего используют метод замораживания-оттаивания, в основе которого лежит принцип разрушения клеточных мембран за счёт образующихся кристаллов льда [22]. Несмотря на простоту, этот метод не получил большого распространения из-за того, что в процессе кристаллизации межклеточной воды может нарушаться и структура матрикса [326].

В случае ферментативных методов для удаления клеток чаще всего применяют трипсин и другие протеиназы [327]. Следует отметить, что при использовании этого метода очень важно корректно подобрать время инкубации, поскольку слишком длительная инкубация приводит к деградации матриксных белков и, соответственно, к альтерации нативной структуры [328]. Также, в некоторых случаях для уменьшения количества нуклеиновых кислот используют обработку нуклеазами, однако при этом есть высокая вероятность сохранения ряда цитозольных компонентов внутри получаемых матриксов [329]. Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что у всех существующих на данный момент методов есть как преимущества, так и недостатки, поэтому для получения матрикса из конкретного органа или ткани необходимо в каждом случае тщательно подбирать условия децеллюляризации.

ВКМ является одним из ключевых факторов опухолевого микроокружения. В частности, показано наличие связей между особенностями состава и структуры матрикса и ответом опухоли на терапию, что позволяет сформулировать новые диагностические и прогностические критерии [330,331]. В связи с этим, одним из направлений применения ДЦЛ матриксов стало проведение фундаментальных исследований в области экспериментальной онкологии благодаря способности моделей опухолевого роста, полученных с их использованием, имитировать структурные и биологические аспекты микроокружения, которые можно наблюдать *in vivo* [22,332]. В рамках таких исследований, матрикс может быть получен из двух основных источников: из нормальных и из опухолевых тканей. Поскольку состав и структура матрикса нормальных и трансформированных тканей отличается [333], выбор донорной ткани определяется задачами исследования. Здоровые ткани обычно используют для изучения взаимодействия опухолевых клеток с нормальным матриксом в процессах инвазии и метастазирования, идентификации опухоль-ассоциированных генов, а также для определения влияния ремоделированного матрикса на восстановление фенотипа

клеток в качестве нового подхода к лечению онкологических заболеваний [334]. Матрикс из опухолевых тканей, в свою очередь, позволяет изучать роль «малигнизированного» матрикса в регуляции поведения опухолевых клеток в первичных или метастатических сайтах, а также для изучения роли ВКМ как модулятора эффектов химио- и радиотерапии [334].

К настоящему времени опубликовано множество успешных примеров использования ДЦЛ матриксов тканей и органов в онкологических исследованиях. Например, в недавнем исследовании на ДЦЛ матриксе здорового лёгкого крысы было показано, что после его рецеллюляризации клетками рака легкого человека различных линий формируются опухолевые узлы с интактной васкуляризацией и паттерном роста, сходным с таковым в условиях *in vivo* [335]. Аналогичным образом, на децеллюляризированной здоровой ткани толстой кишки, полученной от человека, удалось воссоздать полный путь развития опухоли, наблюдаемый в большинстве случаев колоректального рака, от APC²²-мутантной неоплазии до инвазивной опухоли. Используя эту модель, было идентифицировано шесть генов, отвечающих за инвазию, которые ранее в 2D-моделях никогда не проявлялись [336]. Также было показано, что ДЦЛ матрикс, полученный из жировой ткани человека, позволяет достоверно имитировать микроокружение опухоли молочной железы, что позволило авторам исследовать новые аспекты опухолевого роста и развития резистентности этого типа рака [337]. Накопление экспериментальных данных о том, что опухолевые ткани перестраивают внеклеточный матрикс под свои нужды, привела к активным исследованиям влияния трансформированного ВКМ на клеточное поведение. Так, было показано, что ДЦЛ матрикс первичного колоректального рака отличается от здорового, как по структурно-механическим, так и по биохимическим свойствам. После репопуляции опухолевыми клетками только опухолевый матрикс индуцировал избыточную экспрессию ими интерлейкина-8

²² Аденоматозный полипоз кишечной палочки (от англ. Adenomatous polyposis Coli)

(IL-8), хорошо известного промотора ангиогенеза [338]. При использовании матрикса глиобластомы было обнаружено повышение опухолевыми клетками экспрессии MMP9 и белков, принадлежащих к семейству гиалуронансинтаз по сравнению с 2D условиями, что позволило авторам предположить их роль в качестве ключевых медиаторов ремоделирования матрикса и промоторов клеточной инвазии [339]. Аналогичным образом клетки колоректального рака человека, культивируемые в матриксе метастазов колоректального рака в печени, показали повышенную резистентность к действию 5-фторурацила и FOLFIRI (фолиновая кислота – фторурацил – иринотекан) по сравнению с моделью на основе здорового матрикса печени, а также по сравнению с 2D-культурой [340].

Необходимо отметить, что применение ДЦЛ матриксов для моделирования опухолевого роста имеет свои ограничения, среди которых можно выделить низкий уровень воспроизводимости из-за индивидуальных различий в строении ткани, в её механических свойствах и в способности к ремоделированию [341]. Кроме этого, структура и состав матрикса находятся в сильной зависимости от типа ткани, её возраста, наличия или отсутствия патологических процессов в организме, а в случае использования опухолевых тканей — от типа опухоли и её стадии. Такая широкая вариативность получаемых матриксов является как преимуществом, так и недостатком метода. С одной стороны, такая гетерогенность осложняет изучение влияния матрикса как элемента опухолевого микроокружения и интерпретацию получаемых результатов, а также возможности сопоставления с другими моделями. С другой стороны, высокая релевантность исследований по отношению к реальным опухолям *in vivo*, оценка комплексного воздействия сложной среды и получение данных о взаимном влиянии разных аспектов клеточного микроокружения делают такие модели высокоинформативными.

Помимо фундаментальных исследований, ДЦЛ матриксы могут быть использованы для создания и/или тестирования новых методов диагностики и

терапии. Можно ожидать, что в будущем скрининг особенностей ВКМ опухоли пациентов может стать важным инструментом для подбора индивидуальной схемы лечения [342]. Кроме этого, предполагают, что матрикс из нормальных тканей может подавлять пролиферацию опухолевых клеток. Таким образом, нормализация состава и структуры матрикса опухоли может стать методом таргетного терапевтического воздействия. Эта многообещающая гипотеза на данный момент исследуется с использованием как полученного из тканей, так и синтезированного *de novo* матрикса [343,344]. В целом, многочисленные исследования подтверждают, что ДЦЛ матриксы имеют высокий исследовательский потенциал в экспериментальной онкологии благодаря своей способности имитировать клеточное микроокружение с высокой релевантностью. Учитывая усиливающееся внимание к этой теме в последние годы, усовершенствование методов применения ДЦЛ матриксов может преодолеть существующие ограничения между работами *in vitro* и *in vivo*, расширив наши фундаментальные и прикладные знания об опухолях.

В целом можно сделать вывод, что внеклеточный матрикс является одним из ключевых факторов микроокружения, определяющих биохимический и биофизический контекст, влияющие на развитие опухоли. До настоящего времени основное внимание исследователей уделялось химическим свойствам ВКМ. При этом такие параметры, как трёхмерная структура матрикса и его биомеханические свойства изучены существенно меньше, несмотря на явные различия в поведении опухолевых клеток в двумерных и трёхмерных условиях экспериментов [345,346]. В связи с этим требуются более глубокие исследования того, какие именно структурные и биомеханические параметры матрикса могут оказывать ключевое влияние на канцерогенез и развитие опухоли, а также с помощью каких механизмов это влияние может быть реализовано.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Лабораторные животные и извлечение органов

Шестьдесят мышей BALB/C (самки, возраст 8-16 недель) были получены из SPF вивария Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (ННГУ). Животных содержали в стандартных условиях (при температуре 23-25°C и 12-часовом цикле «свет-темнота»), обеспечивали пищей и водой *ad libitum*. Эксперимент был одобрен Комиссией по биоэтике ННГУ (протокол № 15 от 15 февраля 2018 г.). Животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации.

Подвергнутых эвтаназии животных обрабатывали 96%-ным этанолом. Вскрытие проводили в ламинарном боксе с использованием автоклавированных инструментов для обеспечения асептичности процедуры и полученных образцов. У каждого животного были взяты печень, почки, яичники, селезенка и легкие.

2.2 Децеллюляризация органов мыши

Одной из задач работы являлась разработка протокола для получения децеллюляризованных матриц различных органов мыши. В работе было использовано 5 методик децеллюляризации, 4 из которых являются оригинальными. Общий принцип децеллюляризации изображён на рисунке 4. Извлечённые органы промывали в стерильной дистиллированной воде. Жировые спайки (если таковые имелись) удаляли из каждого органа, после чего органы разрезали на кусочки размером 0,3 × 0,3 см (2-5 образцов из одного органа). Далее образцы помещали в плотно закрытые центрифужные пробирки объёмом 50 мл с 25 мл (в случае печени – 40 мл) децеллюляризирующего раствора и инкубировали на орбитальном шейкере со скоростью вращения 120 об/мин. Состав среды, её замены и время инкубации варьировали в зависимости от конкретной методики.

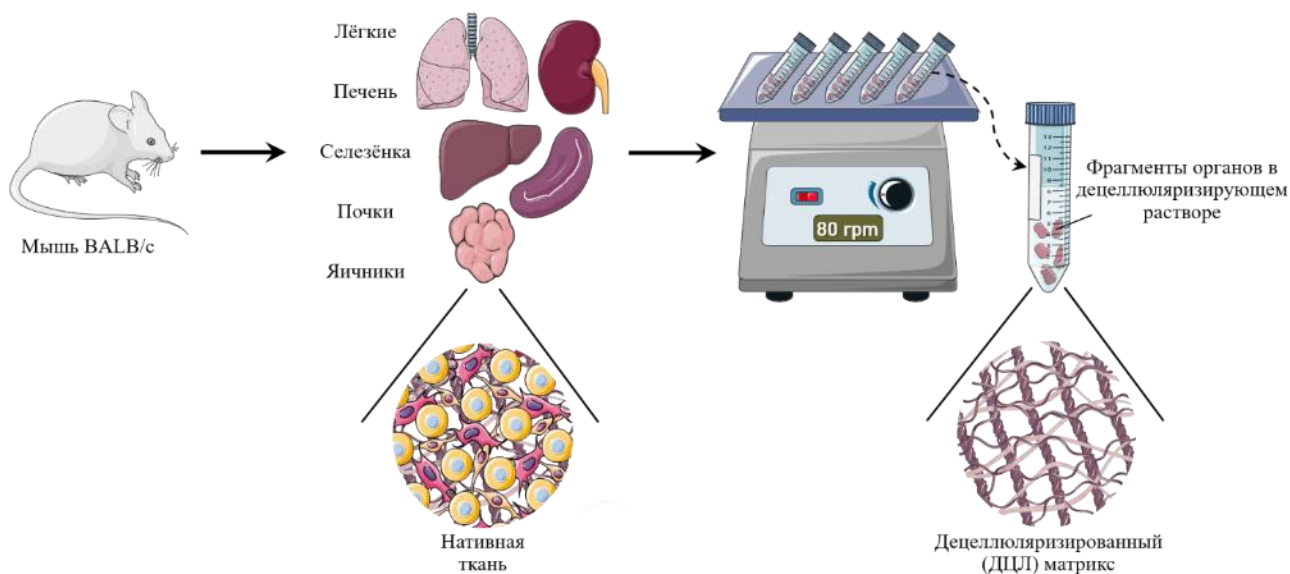


Рис. 4. Общая схема децеллюляризации органов мыши. Пояснения в тексте

1. Методика с использованием SDS

Методика выполнялась в соответствии с работой [318]. Образцы органов инкубировали в 1% растворе додецилсульфата натрия (SDS, Sigma-Aldrich, Берлингтон, Массачусетс, США), с 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (PanEco, Москва, Россия) в течение 48 часов при комнатной температуре.

2. Методика с использованием SDS и Triton X-100

Методика является оригинальной. Образцы органов инкубировали в дистиллированной воде, затем в 1% растворе тритона X-100 (Sigma-Aldrich, Берлингтон, Массачусетс, США), затем в 1% растворе SDS, после чего в 0,5% растворе Triton X-100 и после этого в 0,5% растворе SDS. Временные интервалы составляли 1 час, 1 час, 24 часа, 1 час и 24 часа соответственно. Все среды для децеллюляризации содержали 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

3. Методика с использованием нуклеаз

Методика является оригинальной. Образцы органов инкубировали в растворе Tris-HCl-0,1EDTA (pH=8, ПанЭко, Москва, Россия) при температуре

5°C в течение 48 часов. Затем образцы помещали в 3% раствор тритона X-100 на 48 часов при комнатной температуре. После этого переносили в раствор 0,03 мг/мл РНКазы А (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) и 3.3 UI/мл ДНКазы 1 (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) на 24 часа. Все среды для децеллюляризации содержали 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

4. Методика с использованием трипсина-апротинина

Методика является оригинальной. Образцы органов инкубировали в 1% растворе тритона X-100, затем в дистиллированной воде, после этого в растворе трипсина-Версена Tr (0.5%)-Vers (0.2%). Для нейтрализации действия трипсина на коллагеновые волокна, органы переносили в 0,8% раствор ингибитора трипсина, апротинина (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США), после чего продолжали децеллюляризацию в 0,5% растворе SDS и 0,5% растворе тритона X-100. Все среды для децеллюляризации содержали 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Временные интервалы составляли 2 часа, 1 час, 1 час, 1 час, 24 часа и 12 часов соответственно.

5. Методика с использованием SDC

Методика является оригинальной. Образцы органов инкубировали в 0,5% растворе тритона X-100, затем в 0,5% растворе SDS, затем в 1% растворе дезоксихолата натрия (SDC, Sigma-Aldrich, Берлингтон, Массачусетс, США). Все среды для децеллюляризации содержали 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Временные интервалы составляли 1 час для каждого реагента. После этого образцы помещали в 0,075% раствор SDS на 24 часа при комнатной температуре.

2.3 Анализ содержания ДНК в ткани

Подтверждение степени очистки получаемых матриксов от клеток исходной ткани осуществляли путем определения количества ДНК.

Для определения содержания ДНК брали образцы как нативных тканей, так

и полученных ДЦЛ матриксов массой 0,5г, измельчали в жидком азоте с последующей инкубацией в растворе 0,12% коллагеназы II типа (PanEco, Россия) и 0,08% трипсина в 1 мл модифицированной среды Игла Дульбекко (DMEM, PanEco, Россия) в течение 1,5 ч при 37°C. Полученную смесь центрифугировали (400 g, 10 мин) и осадок промывали 200 мкл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS; pH = 6.8, PanEco, Россия). ДНК выделяли с помощью коммерческого набора ExtractDNA (VM011, Evrogen, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Измеряли оптическую плотность полученного раствора нуклеиновых кислот на капельном спектрофотометре NanoVue (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) с автоматическим пересчётом на концентрацию ДНК.

2.4 Клеточные линии и культивирование клеток

В работе исследовали возможность репопуляции полученных ДЦЛ матриксов опухолевыми клетками. Для решения этой задачи использовали клеточные линии 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).

Клетки культивировали на среде DMEM, содержащей 2 мМ глутамина (PanEco, Россия), 10% (в/в) сыворотки новорожденных телят (NBCS, Gibco, Te Aroha, Новая Зеландия), 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (PanEco, Москва, Россия) при температуре 37 °С в 5% CO₂. Для пассирования клетки отделяли от культурального флакона (Corning, США) раствором Версена (PanEco, Москва, Россия).

2.5 Рецеллюляризация матриксов

Рецеллюляризацию, или заселение, опухолевыми клетками проводили путем их инъекции в ДЦЛ матриксы. Предварительно ДЦЛ матриксы отмывали от остатков детергентов и насыщали нутриентами. Для этого их последовательно

инкубировали при постоянном помешивании на орбитальном шейкере со скоростью вращения 60 об/мин в PBS в течение 4 дней со сменой раствора каждые 24 ч, затем в среде DMEM в течение 72 ч, после чего в DMEM с 30% сывороткой в течение 7 дней.

На предварительном этапе экспериментов были опробованы несколько методов рецеллюляризации, в том числе поверхностное нанесение клеток, инъекция с помощью шприца, инкубация матрикса в клеточной суспензии. Оптимальной для используемых в работе образцов была признана инъекция, что согласуется с результатами ряда других исследований [26,27]. Общая схема метода представлена на рисунке 5.

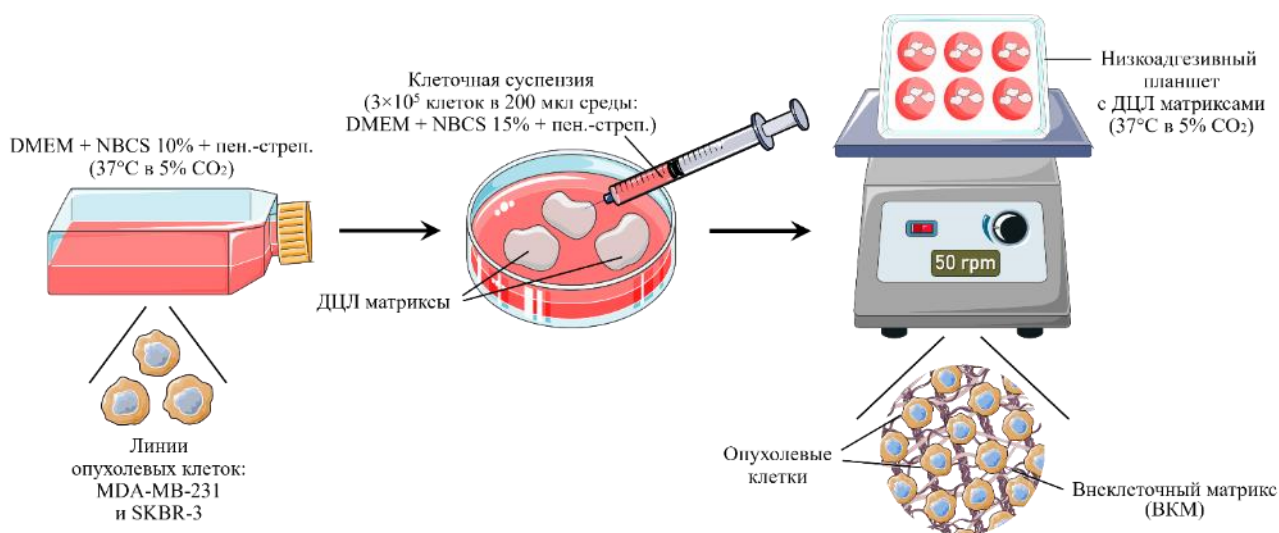


Рис. 5. Общая схема рецеллюляризации бесклеточных органных матриксов

Для заселения опухолевыми клетками каждый матрикс помещали в индивидуальную лунку 6-луночного планшета со сверхнизкой адгезией (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США). Матрикса заселяли путем инъекции 300 000 клеток в 500 мкл полной питательной среды, клеточную суспензию распределяли внутри матрикса несколькими инъекциями с помощью инсулинового шприца с диаметром иглы 0,45 мм. После инъекции в каждую лунку планшета добавляли по 5 мл DMEM с 15% сывороткой. Затем матриксы инкубировали при 37°C в

атмосфере 5% CO₂ в течение 7 дней. Через день отбирали среду из каждой лунки и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Полученный клеточный осадок разводили в полной питательной среде и суспензию повторно вводили в матриксы. В экспериментах по исследованию фенотипических особенностей опухолевых клеток при длительном (до 1 месяца) культивировании в матриксе, аналогичная процедура рецеллюляризации была проведена на протяжении 7, 14, 21 и 28 дней.

2.6 Культивирование опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле

Для сравнения роста опухолевых клеток в ДЦЛ матриксах и искусственных матриксах на основе коллагена была проведена серия дополнительных экспериментов. Были получены культуры исследуемых линий клеток в коллагеновом гидрогеле. Коллагеновый гидрогель готовили, как описано в работе [347]. Гидрогели получали в 6-луночной планшете (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США) путем тщательного перемешивания следующих компонентов: 1600 мкл охлажденного коллагенового раствора (коллаген I типа из крысиных хвостов, 1,2 мг/мл, растворенный в 0,1% уксусной кислоте); 450 мкл питательно-буферного раствора, содержащего 10× DMEM (Biowest, Нуайе, Франция), 25 мМ глутамина, 1 М HEPES²³ (PanEco, Москва, Россия) и 50% сыворотки новорожденных телят (NBCS); 3 × 10⁵ клеток в 200 мкл DMEM и 134 мкл 0,34 М NaOH. Смесь инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 15-20 мин до полного застывания. Концентрация клеток составляла 1,25 × 10⁵ клеток на 1 мл геля. После затвердевания гидрогеля в лунки добавляли по 2 мл DMEM с 10% сывороткой и гидрогели отделяли кончиком пипетки от стенок лунки планшета. Гидрогели с клетками инкубировали при 37°C в 5% CO₂; питательную среду заменяли на свежую каждые 72 ч.

²³ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

2.7 Гистоморфологический анализ

Сохранность основных гистологических структур в получаемых ДЦЛ матриксах, а также анализ роста и инвазии опухолевых клеток в матриксах были оценены методом гистоморфологического анализа.

Как нативные, так и ДЦЛ органы помещали в 10%-ный нейтрализованный формалин (Biovitrum, Санкт-Петербург, Россия) на 24 ч при комнатной температуре. Затем их промывали от избытка фиксатора под проточной водой в течение 20 мин и обезвоживали в 5 повторностях модифицированного изопропилового спирта “Блик” (BlikMediklProduction, Таганрог, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Матрикса заливали в парафин и готовили срезы (2 среза на 1 образец) толщиной 7 мкм с использованием микротомы Eprexia HM 325 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Минимальное количество срезов с одного образца составило 80. Окрашивание предметных стекол гематоксилин–эозином (Гематоксилин Майера, 1% водный раствор эозина; Биовитрум, Россия) проводили в соответствии с инструкциями производителя. Затем предметные стекла монтировали с помощью монтировочной среды Shandon (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) и анализировали на микроскопе Zeiss Vert.A1 (Zeiss, Оберкохен, Баден-Вюртемберг, Германия) с объективами Zeiss LD A-Plan $\times 10$ и $\times 20$ (Zeiss, Оберкохен, Баден-Вюртемберг, Германия).

Площадь пор в матриксах анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.50i, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США) (рис. 6). Исходное гистологическое изображение (А) было преобразовано в 8-битное изображение, инвертировано и изменено на черно-белое с отрегулированным порогом для обеспечения визуальной целостности пор и низкого фонового шума (Обработать–Двоичное–Создать двоичное; Изображение–Настроить–Порог) (Б). Каждая пора и волокно были очерчены для расчёта площади (Обработать–Двоичное–Обвести) (В). Площади

индивидуальных пор была рассчитаны автоматически с набором следующих настроек: Включить отверстия и Показать наложение. Для анализа всех пор, а также чтобы убедиться, что программа измеряет отдельные поры, а не их кластеры были использованы следующие настройки (Анализ–Анализировать частицы–Показать наложение+включить отверстия) (Г).

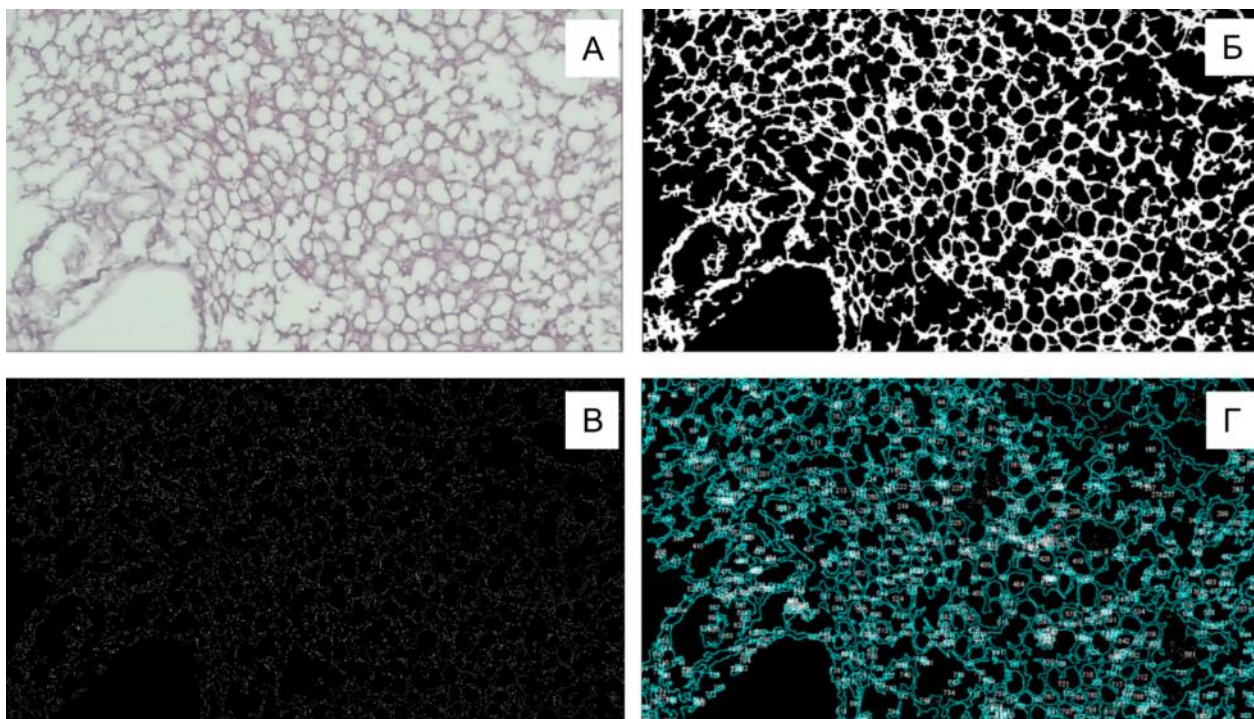


Рис. 6. Пошаговая стратегия обчёта площади пор в ДЦЛ матриксах с использованием программы ImageJ. Размер кадра 0,35 мм². Пояснения приведены в тексте

Количество клеток в матриксах было определено путем анализа изображений с помощью программного обеспечения Labscope (версия 3.4, Zeiss, Оберкохен, Баден-Вюртемберг, Германия) и инструмента аннотирования и измерения-подсчета. Полная площадь образца соответствовала 1мм². Было рассчитано среднее количество клеток на единицу площади матрикса по результатам усреднения значений, полученных для 10 индивидуальных срезов 5 образцов каждого типа матрикса. Для качественной оценки была применена следующая шкала: менее 10 клеток на 1 мм² – «единичные клетки»; от 10 до 50

клеток на 1 мм^2 – «мало»; от 50 до 100 клеток на 1 мм^2 – «среднее количество».; более 100 клеток на 1 мм^2 – «много».

Ядерно-цитоплазматическое соотношение (N/C) измеряли с помощью программы ZenLight (версия 3.0.79.0000, Zeiss, Оберкохен, Баден-Вюртемберг, Германия). Измерения проводили для 10 образцов для каждого варианта матрикса, по 5 полей в каждом, по 30 клеток в каждом из полей зрения.

2.8 Сканирующая электронная микроскопия

Особенности микроструктуры полученных ДЦЛ матриксов определяли с помощью сканирующей электронной микроскопии. Исследование выполнено в Институте молекулярной тераностики Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Образцы тканей лиофилизировали с помощью сублимационной сушки Labconco при температуре -70°C в течение 24 часов. Чтобы исключить накопление поверхностного заряда во время сканирования электронным пучком в колонке микроскопа, на образцы был нанесен тонкий проводящий слой хрома путем физического осаждения из газовой фазы (PVD-покрытие, Covar с контроллером осаждения INFICON SKK-310, Angstrom Engineering, США).

Микроструктуру децеллюляризованных тканей изучали с помощью настольного сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus (Hitachi, Marunouchi, Chiyoda-ku, Токио, Япония) при напряжении 10-15 кВ в режиме обратного рассеяния электронов.

Размеры пор и волокон измерялись вручную с помощью программного обеспечения ImageJ. Для каждого типа матрикса было исследовано 5 независимо полученных образцов, для каждого образца было проанализировано 6 полей зрения с измерением 30 пор в каждом поле.

2.9 Макроиндентирование

Общую жёсткость трехмерной структуры получаемых ДЦЛ матриксов измеряли с помощью метода макроиндентации. Эксперименты по

макроиндентированию проводились в отделе современных биоматериалов Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова с помощью универсальной микромеханической системы Mach-1™ v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, QC, Канада).

Образцы нарезались на кусочки размером 5 мм с учётом анатомического строения каждого органа, таким образом, чтобы в срез попадали все основные структуры. Также, стороны срезы были выровнены для минимизации влияния макроскопических геометрических характеристик органа на измерения. Для измерений на матриксах использовался рубиновый сферический индентор радиусом 1 мм. Перед измерениями к нижней платформе прибора был приклеен кусочек наждачной бумаги, что предотвращало боковое смещение образца во время вдавливания. В течение всего измерения образец поддерживали влажным, добавляя PBS на поверхность матрикса.

В случае коллагенового гидрогеля использовали металлический сферический индентор радиусом 3,175 мм, измерения, в связи с низкой жёсткостью образца проводили в лунке 6 луночного планшета в среде DMEM.

При начале эксперимента с помощью функции прибора “Найти контакт” определяли точное положение подложки (наждачной бумаги). Эта функция обеспечивает перемещение индентора до тех пор, пока датчик не зарегистрирует заданную нагрузку (0,1 Н). Эти данные впоследствии использовались при расчёте толщины образца.

Используя ту же функцию (“Найти контакт”), образец вдавливали с заданной нагрузкой (0,1–0,2 Н), что обеспечивало глубину вдавливания от трети до половины толщины образца. Полученные зависимости нагрузки (F) от глубины вдавливания (δ) были аппроксимированы моделью Герца с поправкой на конечную толщину образца:

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

где E – модуль Юнга, ν – коэффициент Пуассона образца (был взят равным 0,5, как для большинства биологических образцов), и $f(\delta)$ является функцией коррекции толщины. Подробности применения модели описаны в работе [348]. Были проанализированы матриксы каждого из исследуемых органов от 10 различных животных; было выполнено от 3 до 5 измерений в разных областях каждого образца.

2.10 Наноиндентирование методом атомно-силовой микроскопии

Жёсткость отдельных волокон получаемых ДЦЛ матриксов измеряли с помощью метода атомно-силовой микроскопии. Эксперименты по наноиндентированию проводились в отделе современных биоматериалов Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова с использованием атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США).

Замороженные срезы матриксов толщиной 20 мкм были получены с использованием ротационного криотома ThermoScientific HM525NX (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США). Срезы переносили на гистологические предметные стекла, затем отмывали от криосреды Shandon Cryomatrix (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США), в которой они находились, с помощью PBS. Измерения и обработка результатов проводились как описано в работе [348]. Измерения проводили в PBS в режиме объемного усилия с использованием специально модифицированных консолей SAA-NPI (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США), которые имели постоянную пружины, откалиброванную производителем (0,186 Н/м), и радиус кривизны наконечника 3,5 мкм (полусфера). В режиме Force Volume был получен массив силовых кривых (карт) по сетке размером от 10×10 до 100×100 мкм, состоящий из точек от 20×20 до 64×64 . Было получено по 5 образцов каждого типа матрикса, из каждого из

которых было получено по 5 срезов. С каждого среза было получено 5-6 массивов силовых кривых.

Индивидуальные кривые силы были получены со скоростью 20 мкм/с, глубина вдавливания составляла менее 1 мкм, таким образом, коррекция толщины образца не требовалась (глубина < 5% толщины). Для обработки была применена модель Герца в соответствии с выражением (4). Затем значения были усреднены между всеми силовыми кривыми карты и между всеми картами, чтобы получить среднее значение модуля Юнга и среднеквадратическое отклонение (SD) образца.

2.11 Реометрия

Для определения жесткости коллагенового гидрогеля дополнительно применяли метод реометрии. Реологические эксперименты с коллагеновыми гидрогелями проводили в отделе современных биоматериалов Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова с использованием реометра Physica MCR 302 (Anton Paar, Грац, Австрия) в колебательном режиме при комнатной температуре в камере с высокой влажностью, как описано в работе [349]. Использовали геометрию пластина–пластина (диаметр верхней пластины 25 мм) с зазором в 1 мм, что соответствовало 0,5 мл раствора для пробы.

Для реологического анализа коллагеновый гидрогель готовили в пробирке объемом 2 мл путем последовательного смешивания следующих растворов в аналогичных пропорциях: 800 мкл коллагенового предварительного геля, 225 мкл питательно-буферного раствора, 100 мкл DMEM и 67 мкл 0,34 М NaOH. Полученную смесь помещали на измерительную площадку реометра сразу после добавления NaOH, после чего сразу начинали измерения.

Коллагеновый пре-гель помещали на измерительную пластину сразу после смешивания с 0,34 М NaOH, и измерения начинались немедленно. Были проведены изотермические измерения с контролируемой амплитудой

деформации 0,5% и частотой 1 Гц при 25°C. Испытания повторяли три раза; измеряли упругую составляющую – модуль накопления, G' (Па), и вязкую составляющую – модуль потерь, G'' (Па) для определения комплексного модуля сдвига G (3).

2.12 Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Для решения задачи по определению влияния культивирования в матриксе на уровень экспрессии ряда генов матриксных рецепторов, ферментов и транскрипционных факторов, был применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

РНК выделяли из замороженных образцов рецеллюляризованных матриксов с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoVue Plus (GE HealthCare, США) и электрофореза в 1% агарозном геле (20 мин, 7 В/см). Для удаления примеси ДНК полученные образцы РНК обрабатывали ДНКазой DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) и oligo(dT)₁₅ праймера (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических праймеров (таблица 1) и набора qPCRmix-HS SYBR+HighROX (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

В реакционную смесь добавляли по 1 мкл кДНК (4 технические повторности каждой реакционной смеси и отрицательного контроля). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе The Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Программа ПЦР включала следующие этапы: 1) горячий старт при 95°C, 10 мин; 2) денатурация ДНК при 95°C, 15 с; 3) отжиг праймеров, синтез ДНК и детекция флуоресцентного сигнала при 60°C, 1 мин. Этапы 2–3 повторяли 40 раз. Значения

порогового цикла (Ct) определяли с помощью программного обеспечения 7500 Software (Applied Biosystems, США).

Таблица 1.

Праймеры исследуемых генов для ПЦР в реальном времени

Белок	Ген	Код GenBank	Длина продукта, п.н.	Праймеры (5'–3'), сверху — прямой, снизу — обратный
Транскрипционный фактор Snail	<i>SNAIL</i>	NM_005985	102	CTATGCCCGCTCTTTCCTC
				GCTGCTGGAAGGTAAACTCTGGAT
Транскрипционный фактор Slug	<i>SLUG</i>	NM_003068	104	CCCACACATTACCTTGTGTTTGC
				AGAAAAAGGCTTCTCCCCCGTG
Матриксная металлопротеиназа 9	<i>MMP9</i>	NM_004994	108	CTTCCAGTACCGAGAGAAAGCC
				TCA TAGGTCACGTAGCCCACT
Рецептор Notch1	<i>NOTCH1</i>	NM_017617.4	108	GGGGCCCTGAATTTCACTGT
				CCGCAGAGGGTTGTATTGGT
Дискоидин-доменный рецептор 1	<i>DDR1</i>	NM_001297653.1	159	GCCACCAAGAATGCCAGGAA
				GAGGAACTGGTTGAGGTCGC
Субъединица интегрин β_1	<i>ITGB1</i>	NM_033668	100	GCCAAATGGGACACGCAAGA
				CACCGGCAATTTAGAGACCAGC
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	<i>GAPDH</i>	NM_002046	102	GACAGTCAGCCGCATCTTCT
				GCCCAATACGACCAAAATCCGT
Белок-гомолог Pumilio 1	<i>PUM-1</i>	NM_014676	125	TTCTTCAGACCAGCAGAATGAG
				CAAAGACTGGGGCTGTACACAT
β -Актин	<i>ACTB</i>	NM_001101.3	113	CCTTCCTTCCTGGGCATGGAATCC
				CACCAGACAGCACTGTGTTGGCA

Полученные результаты анализировали по методике $\Delta\Delta C_t$. Изменение относительной экспрессии (RQ) определяли по формуле: $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ [350]. В качестве референсных генов использовали гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GADPH), белка-гомолога Pumilio 1 (PUM1) и бета-актина (ACTB), экспрессия которых по данным литературы [351,352] при переходе к росту в трехмерной культуре не изменяется.

Для построения тепловых карт и кластеризации использовали онлайн-программу SRplot [353], доступную по ссылке: https://www.bioinformatics.com.cn/plot_basic_cluster_heatmap_plot_024_en.

2.13 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.

Для анализа экспрессии генов в клетках, растущих в разных матриксах, использовали кластерный анализ, который был выполнен с помощью программы SRPlot (алгоритм кластеризации — метод полной связи; мера расстояния — эвклидово расстояние).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение децеллюляризованных матриксов мышечных органов

Для получения децеллюляризованных матриксов нами были выбраны органы мышц. 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 [320,327], что снижает итоговый выход матриксов от одного животного, а также уменьшает выбор объектов для тестирования. В связи с этим нами были проверены возможности адаптации протокола децеллюляризации для получения матриксов разных органов. Выбор органов для децеллюляризации (легкие, печень, почки, селезенка и яичники) был обусловлен их принципиально разными структурными и механическими свойствами. В качестве органа сравнения нами была выбрана кожа, радикально отличающаяся от внутренних органов.

Нами была проверена эффективность опубликованной в литературе методики, основанной на использовании одного поверхностно-активного вещества, анионного детергента дезоксихолата натрия (SDS), а именно его раствора (протокол 1). Важными преимуществами методики являются простота и скорость. В литературе описана возможность применения этой методики для получения ДЦЛ матриксов роговицы, поперечно-полосатой мускулатуры, печени и ряда других тканей и органов животных, что позволило нам предположить его эффективность для децеллюляризации органов мышц [319,354,355]. Метод с использованием 1% SDS позволил получить матриксы большинства взятых для исследования органов мышц. Полученные матриксы были оптически прозрачны, что свидетельствует об удалении клеток из ткани.

Однако при морфологическом анализе характерная органная структура в большей части матриксов была неопределима. При этом лёгкие и печень были в наибольшей степени подвержены разрушению при процедуре децеллюляризации; матриксы этих органов практически полностью перешли в гелеобразную форму. Более сохранившими целостность органами являлись селезёнка, яичники и почки. В связи с высокой степенью нарушения макро- и микроскопической целостности матриксов, было принято решение оптимизировать методику децеллюляризации.

На основе анализа литературы и собственных данных было предложено три протокола, предполагающих более мягкую децеллюляризацию. Основными критериями успеха протокола были приняты высокий уровень элиминации клеточного компонента и сохранение большинства первичных гистологических структур органа. Детали протоколов подробно описаны в разделе 2.2. Первый из оригинальных протоколов (протокол 2 в разделе 2.2) заключался в чередовании растворов неионного детергента тритона X-100 и SDS. Первым этапом протокола является часовая инкубация в 0,5% растворе тритона X-100, которая позволяет быстро разрушить мембраны клеток поверхностного слоя и предотвращает возможную активацию некроза, предотвращая высвобождение в ткань гидролизующих ферментов. Следующим этапом является инкубация в 1% SDS, что позволяет нейтрализовать остатки заряженных молекул, снижая адгезию клеток к матриксу, и обеспечивает дальнейшее разрушение мембран. Далее концентрации растворов снижали до 0.5%, что должно было позволить провести более мягкое разрушение мембран клеток, находящихся в глубине ткани, без разрушения белков матрикса. Время протокола также было снижено с 72 часов (протокол 1) до 51 часа, что снижало время взаимодействия матрикса с детергентами.

Поскольку одним из общепринятых стандартов чистоты получаемых матриксов является минимальное количество остаточной ДНК, одним из

вариантов опробованных методик стал протокол с использованием нуклеаз (протокол 3). На первом этапе ткани инкубировали в Tris-HCl-0,1EDTA, что позволяло, с одной стороны, обеспечить достаточную ионную силу раствора для предотвращения денатурации белков матрикса, а с другой стороны, связать двухвалентные ионы, чтобы снизить адгезию клеток. Далее матриксы инкубировали 48 часов в 3% растворе тритона X-100. Несмотря на достаточно высокую концентрацию детергента, в литературе имеются данные о том, что его воздействие на матрикс минимальное [356]. Финальный этап протокола заключался в инкубации органов в растворе РНКазы А и ДНКазы 1, что позволяло избавиться от остатков нуклеиновых кислот. Общее время протокола составляло 96 часов.

В поисках оптимального соотношения между степенью элиминации клеток и влиянием на состав и структуру матрикса нами был также опробован протокол, заключающийся в использовании раствора трипсина и его ингибитора апротинина (протокол 4). На первой стадии протокола органы инкубировали в 1% растворе тритона X-100, способного, как описывалось выше, к мягкой солюбилизации мембран клеток плотного поверхностного слоя. Далее, производили инкубация в дистиллированной воде для создания осмотического шока и разрушения клеточных структур. На следующем этапе органы инкубировали в растворе трипсина-Версена, что снижало адгезию клеток к матриксу в глубоких слоях за счёт связывания двухвалентных ионов ЭДТА, входящей в состав раствора Версена, с одновременным набуханием коллагеновых волокон под воздействием трипсина и потерей контакта между коллагеном и клетками. Для предотвращения необратимой денатурации коллагена на следующем этапе органы инкубировали в растворе апротинина. Для завершения децеллюляризации органы последовательно инкубировали в 0,5% растворах SDS и тритона X-100 для финальной солюбилизации мембран прикреплённых клеток. Общее время протокола составило 41 час.

Внешний вид органных матриксов, полученных с использованием трех оптимизированных протоколов, демонстрировал бóльшую степень сохранности структуры по сравнению с протоколом 1. При этом матриксы, полученные методом с использованием нуклеаз (протокол 3) отличались более высокой визуальной целостностью и оптической прозрачностью, в то время как у матриксов, полученных методом с использованием трипсина (протокол 4) нами были отмечены большая плотность и непрозрачность.

С помощью гистоморфологического анализа (рис. 7) было установлено, что разработанные протоколы оказывают разное влияние на структуру получаемых матриксов и в разной степени подходят для конкретных органов. Так, метод на основе комбинации SDS и тритона X-100 (протокол 2) хорошо элиминировал клетки из всех представленных образцов, однако достаточно сильно повреждал микроструктуру матрикса, а также приводил к набуханию коллагеновых волокон. В случае метода с использованием нуклеаз (протокол 3) высокий уровень очистки от клеточного компонента был показан только для лёгких, в то время как в толще большинства анализируемых матриксов оставалось большое количество клеток. Метод с использованием трипсина (протокол 4) хорошо децеллюляризировал почки, но при этом отмечалось значительное набухание коллагеновых волокон в остальных органах. По результатам этого этапа работы было сделано заключение, что предложенные протоколы 2-4 существенно улучшили качество получаемых матриксов, однако результаты нельзя было признать «идеальными».

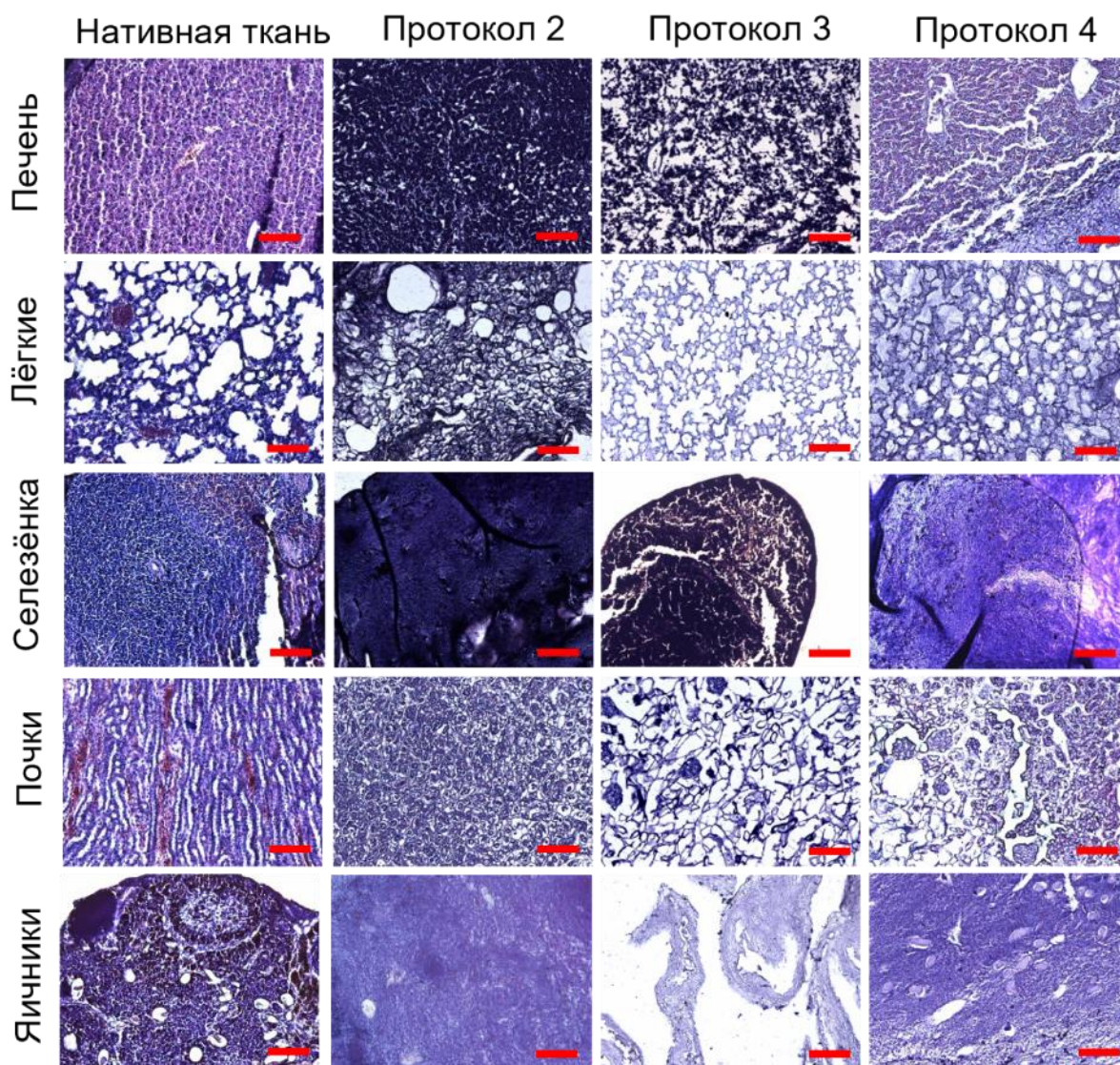


Рис. 7. Гистоморфологический анализ ДЦЛ матриксов различных органов мыши, полученных разработанными методами. Детали протоколов 2-4 описаны в тексте и в разделе 2.2. Размер линейки 100 мкм

Чтобы преодолеть проблему баланса структурной целостности и отсутствия клеток в получаемых матриксах, мы разработали ещё один метод децеллюляризации, основанный тритоне X-100, SDS и анионном детергенте дезоксихолате натрия (SDC) (протокол 5). На первых этапах децеллюляризации мы последовательно выдерживали органы по 1 часу в 0,5% растворе тритона X-100 и 0,5% растворе SDS для начала солубилизации мембран. На следующем этапе мы инкубировали матриксы в 1% SDC в течение часа. По данным

литературы этот детергент обладает высокой способностью растворять мембраны и извлекать мембранные белки, не влияя на белки матрикса [357]. Заключительной стадией децеллюляризации является 24-часовая инкубация в 0,075% SDS, которая завершает разрушение мембран. Одним из широко известных недостатков при использовании SDS в высоких концентрациях является разрушение коллагеновых волокон [319]. В предлагаемом нами протоколе воздействие относительно высокой концентрации (0,5%) этого детергента является кратковременным, что позволяет быстро разрушить мембраны, за которым следует длительное воздействие низкой концентрации SDS (0,075%).

По результатам проведенных экспериментов использование протокола 5 обеспечило получение матриксов с наибольшей сохранностью макро- и микроstructures. Макроскопическая целостность получаемых ДЦЛ матриксов по сравнению с нативными органами представлена на рисунке 8. Для демонстрации универсальности протокола в качестве органа сравнения использована кожа, радикально отличающаяся по своим характеристикам от внутренних органов. Детальное исследование микроstructures характеристик получаемых матриксов изложено в следующем разделе (3.2).

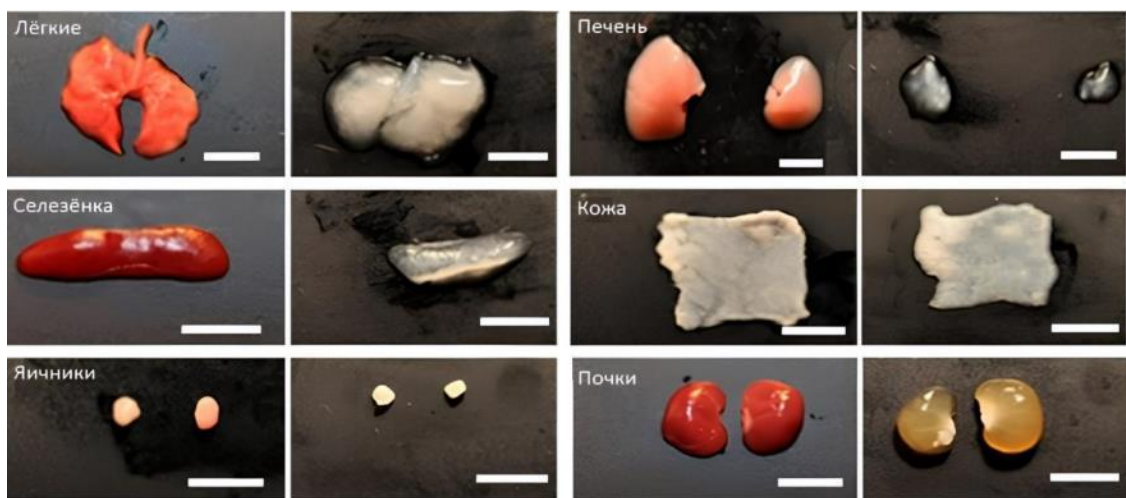


Рис. 8. Сравнение внешнего вида исходных органов и соответствующих ДЦЛ матриксов. Размер линейки 1 см

Одним из общепринятых критериев успешности децеллюляризации и чистоты полученных матриксов является низкая концентрация остаточной ДНК [22]. Нами был проведёно сравнение концентрации ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях. Если в исходных органах содержание ДНК составляло 1-2,5 мг/г сырого веса, то после процедуры децеллюляризации эти значения снизились на три порядка и не превышали 2,2 мкг/г. Таким образом, в матриксах всех исследованных органов общая концентрация ДНК снизилась более чем на 99% (табл. 2), что свидетельствует об успешной децеллюляризации.

Таблица 2.

Содержание ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях мышечных органов

	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
Лёгкие	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

По результатам этого этапа работы нами была предложена методика, позволяющая эффективно децеллюляризовать большой спектр различных органов мыши с сохранением макроскопической целостности и высокой элиминацией клеточного компонента.

3.2 Структурные и биомеханические свойства бесклеточных органных матриц

3.2.1 Гистоморфологический анализ ДЦЛ матриц

Для анализа сохранности структурной целостности ДЦЛ матриц органов с принципиально разными структурными свойствами мы проанализировали гистологические срезы исходных нативных тканей и полученных из них ДЦЛ матриц (рис. 9). Полученные нами по разработанному протоколу матрицы как безкапсульных, так и капсульных органов характеризовались значительным уровнем сохранности 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 гематоксилином-эозином обнаружены не были.

Печень. Децеллюляризация печени привела к получению образцов высокого качества с хорошей визуализацией пор в местах расположения клеток. Подтверждена сохранность структуры портальной зоны, долек и печеночных протоков.

Легкое. В децеллюляризованном легком мы наблюдали умеренное набухание коллагеновых волокон и отсутствие клеточного компонента. Типичные структуры легких, такие как альвеолы, бронхиолы и питающие сосуды, были узнаваемы, и их структура хорошо сохранилась.

Селезенка. После децеллюляризации матрикс селезенки был представлен сетью волокон, в которой были различимы плотные участки на месте белой пульпы и рыхлые участки на месте красной пульпы. В белой пульпе были видны трабекулы с центральными артериями. Клеточные компоненты не обнаружены.

Почка. В децеллюляризованном матриксе почек нами был обнаружен полный пул нативных структур, таких как почечные тельца, нефроны и крупные кровеносные сосуды. Капсула органа была плотной и неповрежденной. На месте

клеток были видны оптически пустые округлые структуры.

Яичник. Полученный матрикс яичника представлял собой гетерогенную сеть волокон с неравномерной плотностью. После децеллюляризации на месте части фолликулов были отмечены пустоты, а на месте других отсутствовали клетки фолликулярного эпителия. Клеток в образце обнаружено не было.

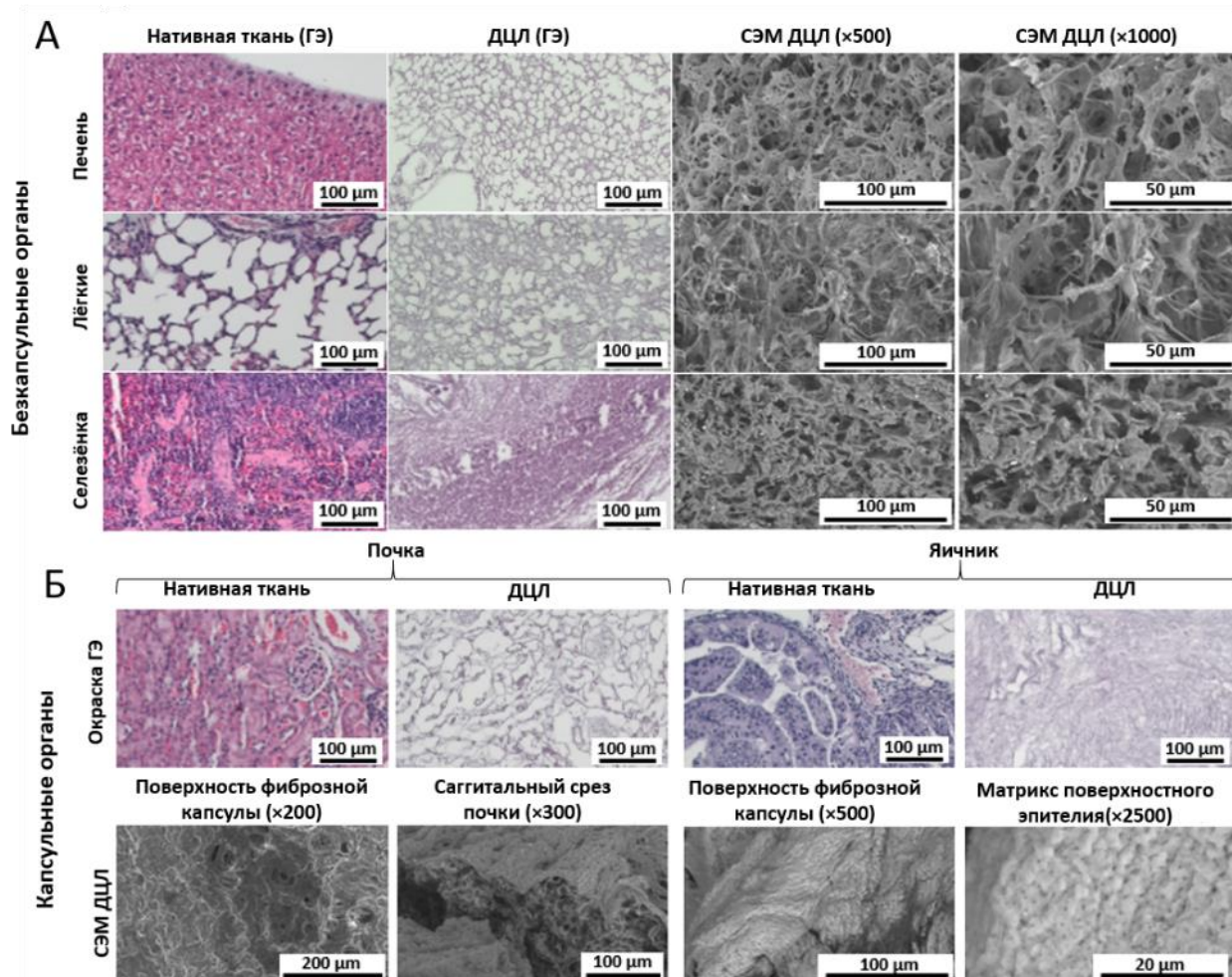


Рис. 9. Гистоморфологический и СЭМ-анализ децеллюляризованных матриксов, полученных из безкапсульных (А) и капсульных органов (Б). Показаны репрезентативные изображения из серии от 20 до 50 образцов. Для гистологического анализа использовано окрашивание гематоксилин–эозином. Два различных увеличения для СЭМ-изображений приведены в (А, Б) для визуализации степени целостности матрикса и морфологии волокон. Для капсульных органов (Б) были получены СЭМ-изображения для различных частей органа для демонстрации вариабельности структуры

Согласно полученным результатам, матриксы всех органов продемонстрировали высокое качество архитектоники и высокий уровень чистоты от резидентных клеток. Однако следует обратить внимание, что предлагаемый протокол адаптирован для образцов размером не более 50 мм³, в противном случае в толще матрикса могут быть обнаружены остаточные клетки.

Для оценки структурных особенностей матриксов разных органов мы проанализировали распределение пор по размерам на основании полученной серии гистологических изображений (рис. 10А). Количественный анализ площади пор 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.

Таким образом, гистологический анализ подтвердил эффективное удаление клеточного компонента и сохранение нативной трехмерной организации структуры матрикса для всех органов, проанализированных в работе.

3.2.2 Анализ микроструктуры ДЦЛ матриксов методом сканирующей электронной микроскопии

Для более детального изучения структуры матриксов мы использовали сканирующую электронную микроскопию. Анализ микроструктуры подтвердил высокую степень очистки всех матриксов от клеточного компонента. При этом показаны тканеспецифичные особенности структуры в отношении размера пор, а также ориентации и толщины волокон (рис. 9, 10Б, 10В).

Матрикс печени представлял собой однородную структуру с высокой пористостью трехмерного волокнистого каркаса со средним диаметром волокон около 1,6 мкм и средней площадью пор 133 мкм². Площадь пор в матриксе легкого была значительно больше (~240 мкм²) при среднем диаметре волокон

1,13 мкм. Матрикс селезенки, напротив, имел более плотную структуру и обладал наибольшей компактизацией волокон, а площадь пор составила ~ 78 мкм².

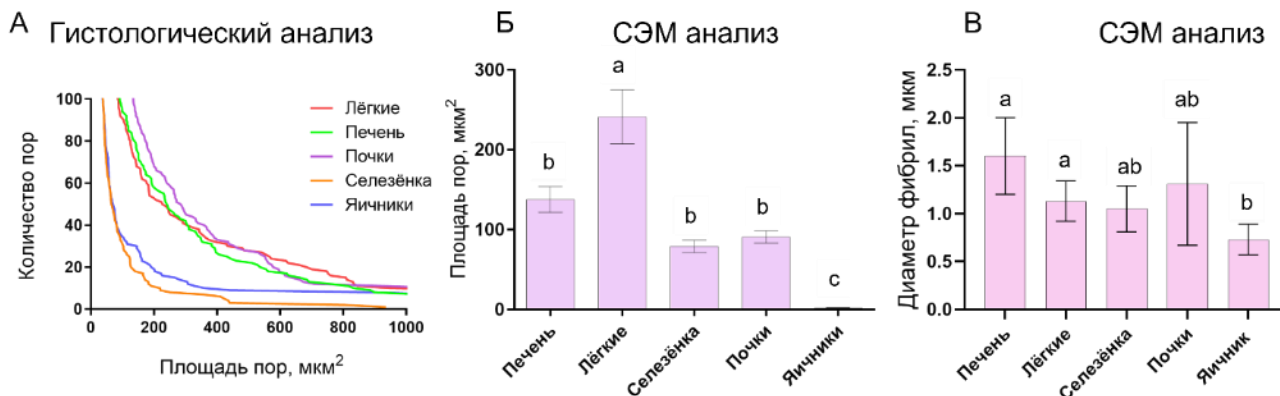


Рис. 10. Микроструктурные характеристики децеллюляризованных матриц. (А) Распределение площади пор в матрицах различных органов по результатам анализа гистологических изображений ($n = 20-50$). (Б) Среднее значение площади пор в матрицах различных органов, рассчитанное по СЭМ изображениям ($n = 20-50$). (В) Диаметр фибрилл в матрицах различных органов, измеренный с помощью СЭМ ($n = 20-50$). Для почки на Б, В, приведены данные по структуре паренхимы органа, для яичника приведены данные по капсуле органа из-за технических ограничений методики. a, b, c – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Почка и яичник окружены соединительнотканной капсулой, что привело к необходимости анализа этих структур по отдельности. Капсула и паренхима матрикса почки значительно отличались по микроструктуре (рис. 9Б). Фиброзная капсула почки представляла собой плотную структуру с равномерно распределенными отверстиями, толщину капсулы можно было оценить как ~ 10 мкм. В то же время паренхима почки представляла собой высокопористую сеть коллагеновых волокон толщиной около 1,31 мкм и средней площадью пор 90 мкм² (рис. 10Б, В). Поверхность соединительнотканной капсулы яичника была рельефной (рис. 9Б), и при большем увеличении был виден матрикс поверхностного эпителия с толщиной фибрилл $\sim 0,73$ мкм и площадью пор $\sim 1,5$ мкм² (рис. 10Б, В). Проанализировать внутреннюю структуру матрикса яичника не удалось из-за технических особенностей пробоподготовки. Следует отметить,

что свойства капсул почек и яичников были разными. Капсула яичников была сильно фибриллярной и плотной с большим количеством мелких пор, в то время как в капсуле почек поры были меньше, а их диаметр больше.

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.

3.2.3 Общая жёсткость трехмерной структуры ДЦЛ матриксов

Для определения макромасштабных биомеханических свойств ДЦЛ матриксов был применён метод макроиндентации. Макроиндентация 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, однако в настоящее время он адаптирован для измерения как жестких, так и мягких тканей [358,359]. В литературе представлены данные по измерению ДЦЛ матриксов различными методами [360-362], однако использованный нами метод не применялся.

По результатам проведенных измерений снижение модуля Юнга наблюдалось в серии селезенка > почка > печень > яичник > легкое с измеренными значениями около 40 кПа, 22 кПа, 20 кПа, 19 кПа и 17 кПа соответственно (рис. 11).

Существенные отличия между разными органами могут быть объяснены их структурными особенностями, например, такими как фибриллярная капсула в случае яичника и почки или высокая плотность и параллельная упаковка волокон в случае селезенки. Из-за отсутствия информации о жесткости матриксов, измеренных с помощью этого метода, мы сравнили полученные результаты с

опубликованными для нативных тканей. Было установлено, что измеренные значения жесткости матриц хорошо согласуются со значениями жесткости интактных органов человека: селезенка ~20 кПа, почки ~10 кПа, легкие ~12 кПа, печень ~9 кПа [363].

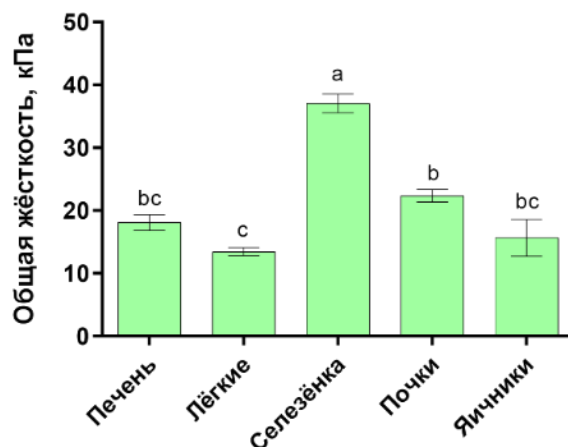


Рис. 11. Жёсткостные характеристики децеллюляризованных матриц, измеренные методом макроиндентирования. a, b, c – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Следует отметить, что, несмотря на очевидную взаимосвязь между общей жесткостью трехмерной структуры ткани и размером пор, между этими параметрами не было обнаружено значимой корреляции (рис. 12), что подтверждает роль других структурных особенностей в данном биомеханическом параметре. Возможные факторы, определяющие жёсткость сложной по структуре биоткани, подробно обсуждены в разделе 1.2.3.

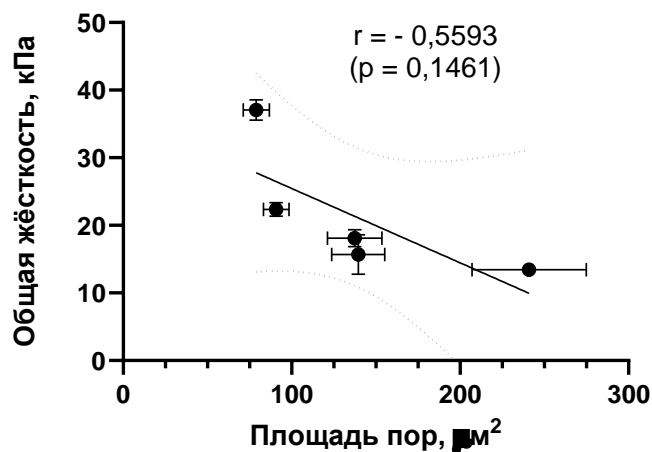


Рис. 12. Анализ корреляции между общей жёсткостью матрикса и площадью пор ($n = 20-30$).

3.2.4 Локальная жесткость волокон ДЦЛ матриксов

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 матриксов 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 [98,364].

Нами был показан относительно большой разброс значений жёсткости волокон между разными органами (рис. 13). Волокна матриксов легкого и селезенки были относительно «мягкими» (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 матрикса почки были промежуточными, 5,6 кПа. Высокая вариативность значений жесткости волокон ВКМ в разных тканях также наблюдалась в предыдущих

исследованиях [309,310] и может отражать особенности химизма и супрамолекулярной организации волокон.

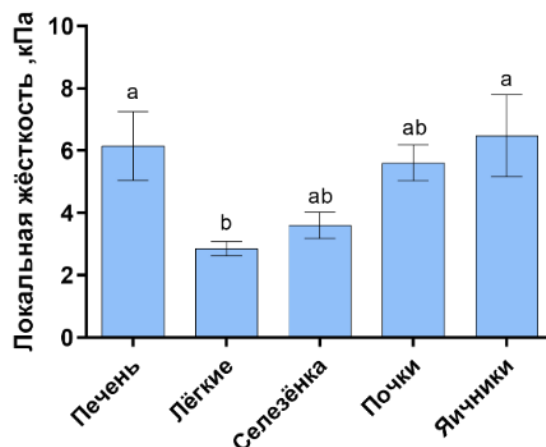


Рис. 13. Жёсткостные характеристики децеллюляризированных матриц, измеренные методом наноиндентирования. a, b, c – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Стоит отметить существенные отличия в значениях жёсткости, полученных при макро- и наноиндентировании. В связи с тем, что архитектура природных тканей достаточно комплексна, жёсткость биологической ткани не может быть определена исходя из жёсткости отдельных её 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. Более подробное описание данных закономерностей представлено в главе 1.2.

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

3.3.1 Скорость роста культур опухолевых клеток в органных матриксах

Нами была проведена репопуляция полученных органных матриксов 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. Линия SKBR-3, в свою очередь, представляет собой высокодифференцированный рак, морфологически мало отличающийся от плоского эпителия, с низкой скоростью роста и низким инвазивным потенциалом [365,366]. Полученные ДЦЛ матриксы заселяли путем инъекции клеток и культивировали в течение 7 дней, после чего готовили гистологические препараты и анализировали. Рецеллюляризованные матриксы анализировали по следующим параметрам: количество клеток, особенности заселения разных структур матрикса, морфотип клеток, пролиферативная активность и ядерно-цитоплазматическое соотношение (рис. 14, 15).

Печень. При рецеллюляризации матрикса печени в паренхиме были обнаружены клетки обеих линий, формирующие кластеры. В случае клеток MDA-MB-231 степень репопуляции была относительно низкой, пролиферативная активность выражена слабо, некоторые клетки изменяли морфотип с выраженного мезенхимального на псевдоэпителиальный (рис. 14). Клетки линии SKBR-3 были обнаружены в матриксах печени в единичном количестве, при этом они сохраняли типичную для клеток этой линии эпителиальную морфологию.

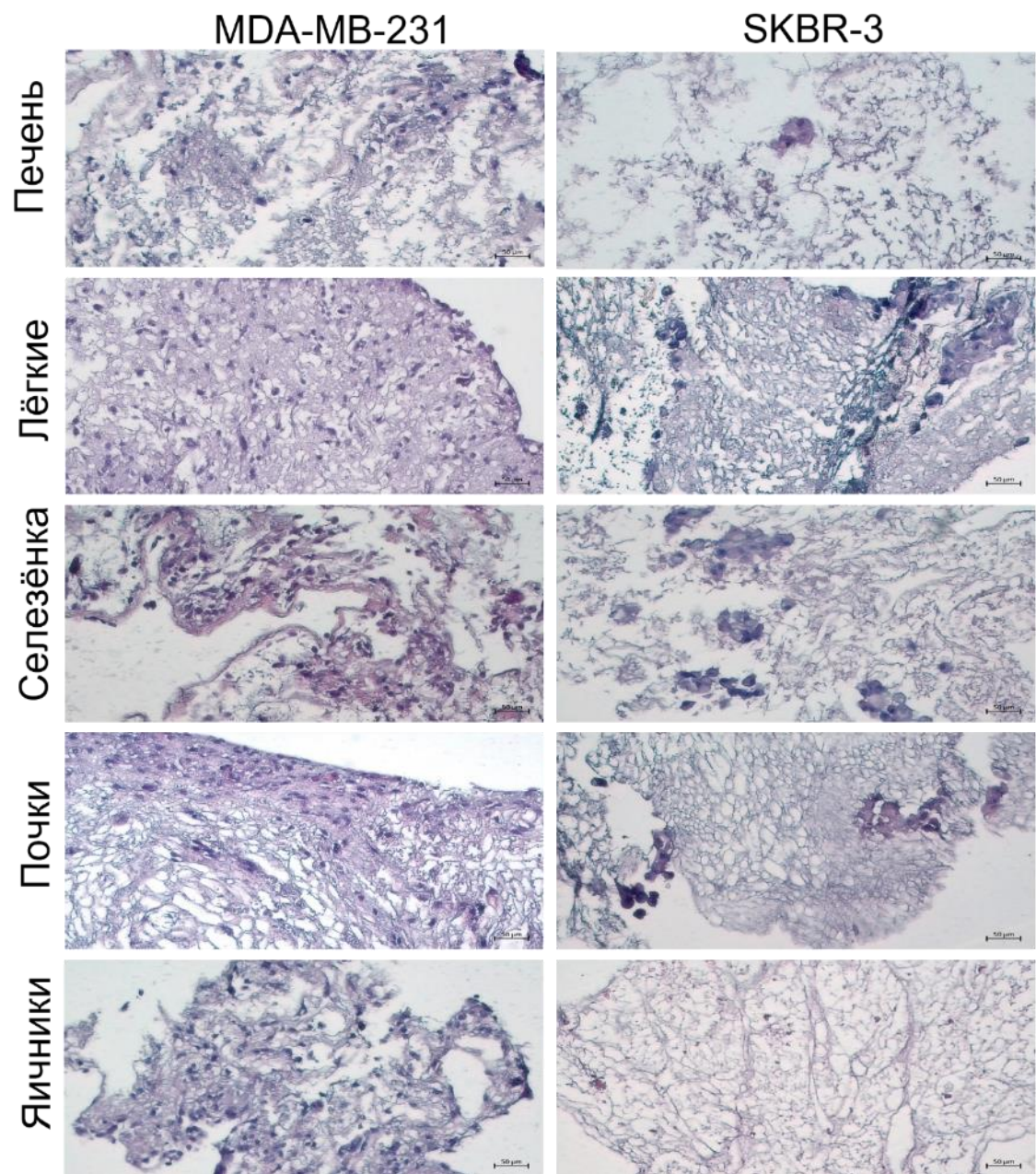


Рис. 14. Гистоморфологический анализ рецеллюляризованных матриц. Для гистологического анализа использовали окрашивание гематоксилин-эозином. Размер линейки 50 мкм

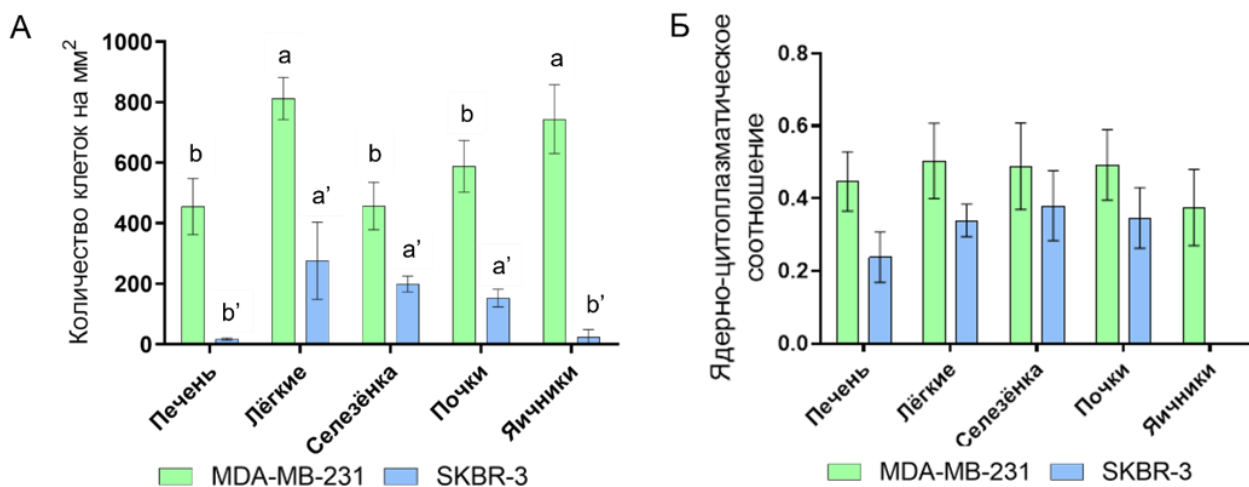


Рис. 15. Количественная оценка заселённости матриц по результатам гистоморфологического анализа приведена на (А). Ядерно-цитоплазматическое соотношение приведено в (Б). a, b – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Легкие. Репопуляция матрикса легкого клетками MDA-MB-231 была существенно более выражена (рис. 14). Клетки были обнаружены по всему пространству матрикса, прикрепляясь как к волокнам дыхательного отдела, так и к остаткам сосудистого русла, и образуя вытянутые тяжи. Форма клеток была фибробластоподобной, а морфотип преимущественно мезенхимальный. Было обнаружено большое количество активно пролиферирующих клеток, по всей видимости, мигрирующих в направлении альвеол. Напротив, клетки линии SKBR-3 образовывали большие скопления, похожие на карциноиды, форма клеток была неправильной, ближе к полигональной, а цитоплазматическая часть была в два раза больше ядерной.

Селезенка. После заселения матрикса селезенки клетками MDA-MB-231 они были обнаружены по внутреннему периметру капсулы с единичной локальной миграцией в центральную часть органа (рис. 14). Клетки образовывали рыхлые скопления, а пролиферативная активность была низкой. В некоторых случаях были обнаружены только ядра, что указывало на гибель клеток. Клетки SKBR-3 были обнаружены во множественных скоплениях, разбросанных по всей паренхиме, клетки демонстрировали редкие признаки пролиферации, а форма

была неправильной, ближе к полигональной.

Почка. Репопуляция матриц почки клетками MDA-MB-231 была средней степени выраженности (рис. 14). Клетки образовывали плотный слой под поверхностью капсулы с длинными нитями глубоко в корковом веществе. В случае клеток SKBR-3 можно было отметить образование псевдоэпителиальных скоплений, расположенных в корковом веществе, количество клеток было небольшим, а пролиферативная активность низкой.

Яичник. После рецеллюляризации матрикса яичника клетки MDA-MB-231 были рассеяны по всей толщине органа, морфологически умеренно мезенхимальные; были обнаружены признаки пролиферации (рис. 14). В случае клеток SKBR-3 были обнаружены только остатки ядер и апоптотические тельца, что указывает на очень низкую эффективность заселения матрикса для этой линии.

Кроме анализа количества клеток в матриксах через 7 дней культивирования (рис. 15А), мы рассчитали ядерно–цитоплазматическое соотношение (N/C) для каждой клеточной линии. Для клеток MDA-MB-231 оно составило 0,4-0,5, а для SKBR-3 – 0,2-0,3 (рис. 15Б). Каких-либо достоверных изменений в соотношении N/C для клеток одной и той же линии, культивируемых в разных матриксах, обнаружено не было. В то же время, была показана существенная разница между линиями MDA-MB-231 и SKBR-3. Более высокое соотношение N/C было характерно для клеток MDA-MB-231, что хорошо согласуется с их более высокой пролиферативной активностью и агрессивностью по сравнению с клетками SKBR-3.

3.3.2 Рост клеток рака молочной железы в коллагеновом гидрогеле

Одним из важнейших факторов, который влияет на рост опухолевых клеток в матриксах, является присутствие коллагена I типа, являющегося лигандом для целого ряда рецепторов на поверхности клетки (подробные сведения приведены в разделе 1.3). Гидрогель на основе коллагена является распространённой

основой для создания 3D моделей опухолевого роста *in vitro*. Чтобы оценить сопоставимость результатов, полученных на ДЦЛ матриксах и на простой модели роста в коллагеновом гидрогеле, мы провели эксперименты с заселением гидрогеля клетками исследуемых линий, а также проанализировали его биомеханические свойства. При этом была выбрана концентрация коллагена, широко используемая в экспериментах с клеточными культурами [309,347].

Коллагеновый матрикс был представлен сетью слабо базофильных волокон, которые не имели четкой упорядоченности (рис. 16 А,Б). В некоторых местах можно было отметить уплотнение волокон. Через неделю культивирования в гидрогеле количество делящихся клеток линии MDA-MB-231 было относительно низким, размеры клеток были уменьшены по сравнению с клетками в ДЦЛ матриксах, форма клеток была выражено фибробластоподобной (рис. 16В). Клетки линии SKBR-3 были обнаружены в единичном количестве, форма была изменена с многоугольной на округлую, скоплений клеток обнаружено не было (рис. 16Г).

Для оценки жёсткости коллагенового гидрогеля был использован метод макроиндентирования. Однако поскольку значения, полученные для гидрогеля (~0,36 кПа), были близки к границе диапазона чувствительности прибора, мы провели дополнительные измерения механических свойств коллагенового гидрогеля методом реологии сдвига, в результате чего было получено значение жёсткости 360 ± 190 Па (рис. 16Д). Таким образом, жесткость коллагенового гидрогеля по крайней мере на порядок ниже таковой ДЦЛ матриксов. Очевидно, что, несмотря на то, что коллагеновый гидрогель обладает химическими характеристиками, сходными с ВКМ, он не обладает такими же структурными и биомеханическими особенностями, что делает эту модель менее актуальной для исследований, направленных на изучение межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с матриксом.

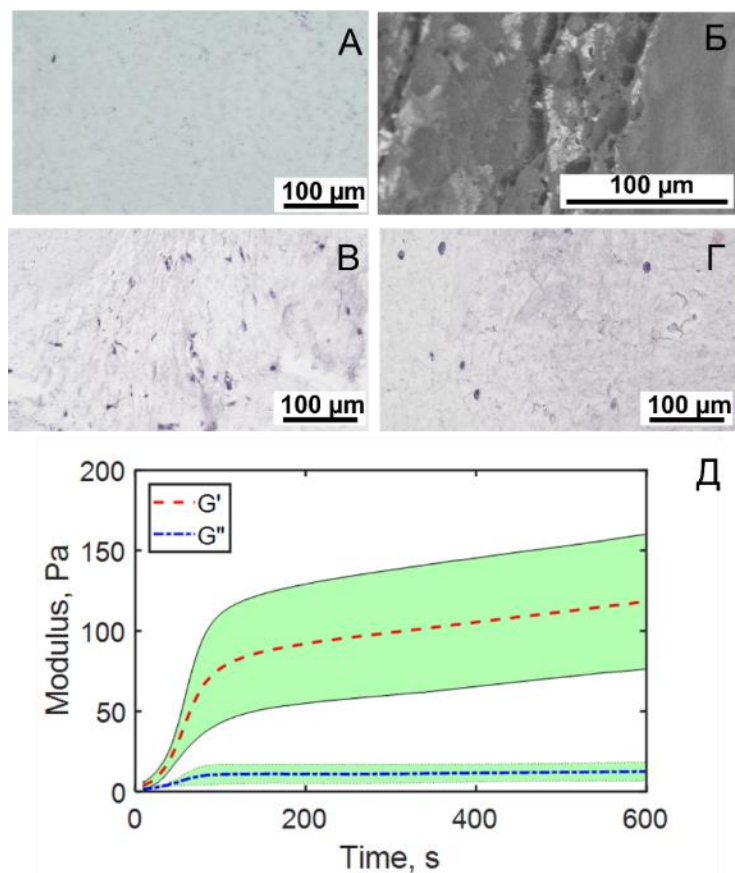


Рис. 16. Анализ свойств коллагенового гидрогеля как искусственного матрикса для культивирования опухолевых клеток. А – гистоморфологический анализ гидрогеля с окраской гематоксилин-эозином. Б – СЭМ изображение. В, Г – рецеллюляризация гидрогеля клетками линии MDA-MB-231 и SKBR-3. Д – Реологическое исследование параметров жёсткости коллагенового гидрогеля (G' - модуль накопления, G'' - модуль потерь)

3.3.3 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

матрицков, а также по морфологии и степени репопуляции матрицков клетками MDA-MB-231 и SKBR-3 (таблица 3) и проведен корреляционный анализ.

Была выявлена сильная отрицательная корреляция ($r = -0,97$, $p < 0,05$) между общей жесткостью матрикса и степенью репопуляции клетками MDA-MB-231 (рис. 17). Также была показана выраженная положительная тенденция связи ($r = 0,84$, $p < 0,1$) между площадью пор и репопуляцией матрицков этими клетками. В то же время степень репопуляции клетками SKBR-3 достоверно коррелирует ($r = -0,94$, $p < 0,05$) с локальной жесткостью. Связи между заселением клетками MDA-MB-231 и локальной жесткостью, или между заселением клетками SKBR-3 и общей жесткостью матрикса или размером пор обнаружено не было. Также ни для одной из линий не было показано связи между заселением матрицков клетками и диаметром волокон.

Таблица 3.

Основные характеристики децеллюляризованных тканей и клеточных популяций в различных матриксах

		Печень	Лёгкие	Селезёнка	Почки	Яичник
Плотность матричных 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 и	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

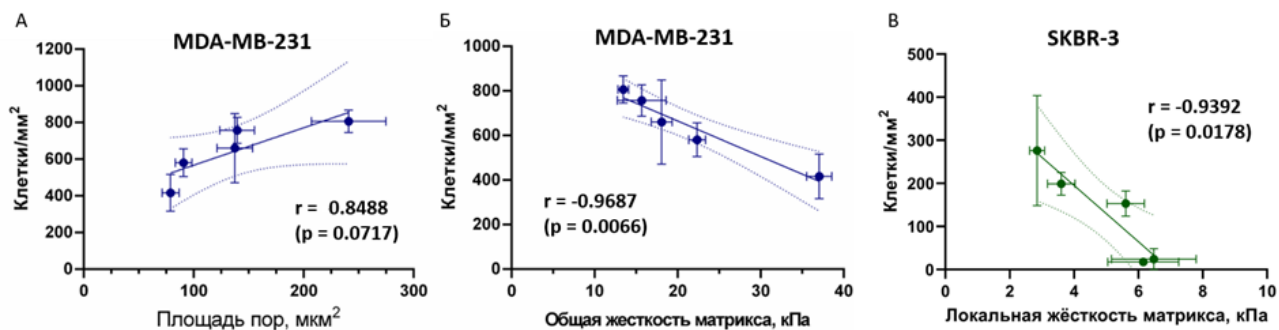


Рис. 17. Анализ корреляции между свойствами матрикса и ростом клеток аденокарциномы молочной железы ($n = 20-30$). (А) Зависимость количества клеток линии MDA-MB-231 от площади пор матрикса. (Б) Зависимость количества клеток линии MDA-MB-231 от общей жёсткости матрикса. (С) Зависимость количества клеток линии SKBR-3 от локальной жёсткости матрикса. Пунктирные линии указывают 95%-ый доверительный интервал для тренда линейной регрессии. Для всех сравнений указан 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.

3.4 Особенности фенотипа клеток рака молочной железы при росте в органных матриксах

3.4.1 Тканеспецифичное изменение экспрессии генов

Анализ роста опухолевых клеток MDA-MB-231 в ДЦЛ матриксах различных органов показал, что пролиферация клеток и их способность заселять разные структуры матрикса (инвазия) тканеспецифична. На основании анализа данных литературы мы предположили, что изменение пролиферативного и инвазивного потенциала может быть связана с проявлением фенотипической пластичности опухолевых клеток (подробно данный вопрос рассмотрен в разделе 1.5). Для проверки данного предположения был проведен сравнительный анализ

экспрессия 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 интегрина β_1) и DDR1 (дискоидин-доменный рецептор 1);
- ген NOTCH1, кодирующий одноименный рецептор — один из основных участников передачи механических сигналов в клетке, регулирующий ключевые триггеры клеточного развития во многих биологических процессах, таких 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).

По результатам анализа 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. Уровень экспрессии генов ITGB1, SLUG и MMP9 при этом достоверно не изменялся (рис. 18).

Наибольшие изменения были зарегистрированы для гена DDR1. 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 [367], в которой показано увеличение уровня экспрессии DDR1 при культивировании клеток колоректального рака в трёхмерном коллагеновом матриксе. Показано также, что разные условия 3D среды влияют на уровень экспрессии данного гена [182].

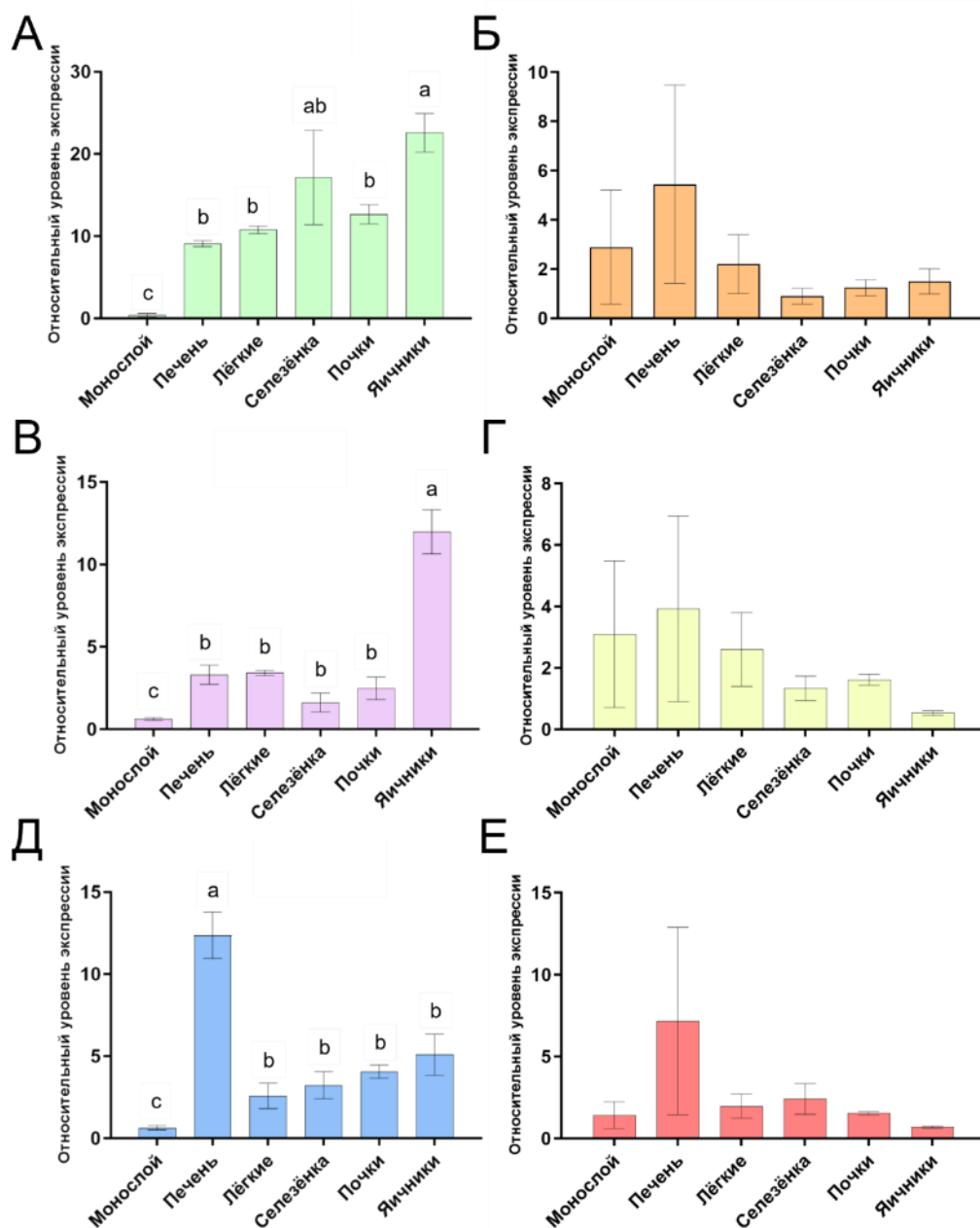


Рис. 18. Относительный уровень экспрессии генов DDR1 (А), ITGB1 (Б), NOTCH1 (В), MMP9 (Г) SNAIL (Д) и SLUG (Е), в клетках линии MDA-MB-231 в монослойной культуре и через 7 сут культивирования в ДЦЛ матриксах разных органов. а, б, с – группы по результатам ANOVA ($p < 0,05$)

Наибольшее отличие экспрессии DDR-1 от монослоя показано в матриксах (яичник, селезенка), в которых размер пор по данным гистологического и СЭМ анализов является наименьшим. Можно предположить, что вынужденное взаимодействие клеток с коллагеновыми волокнами матрикса приводит к

активации дискоидин-опосредованного взаимодействия клеток с матриксом и запуску синтеза данных рецепторов [368].

Стоит отметить, что уровень экспрессии гена *ITGB1*, кодирующего одну из субъединиц другого рецептора коллагена — интегрина, не изменялся (рис. 18, Б). 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 [369].

Уровень экспрессии гена *NOTCH1* при культивировании в матриксах всех органов также достоверно увеличивался по сравнению с монослойной культурой (рис. 18, В). Было показано, что в большинстве 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 [370]. Скорее всего, такое изменение экспрессии может являться результатом увеличения количества контактов между клетками за счёт их расположения в объеме матрикса, что приводит к увеличению латерального взаимодействия рецептора Notch со своими лигандами на поверхностях соседних клеток, активации сигнального пути, а также экспрессии генов самого рецептора по механизму положительной обратной связи [222,223].

Опухолевые клетки способны ремоделировать внеклеточный матрикс за счёт высвобождения в среду матриксных металлопротеаз [371]. Согласно данным литературы, при развитии опухоли уровень экспрессии металлопротеазы MMP9 возрастает [372]. Тем не менее, при относительно краткосрочном, в течение недели, культивировании клеток в матриксах разных органов активации экспрессии гена MMP9 мы не наблюдали (рис. 18, Г).

Согласно многочисленным исследованиям, внеклеточный матрикс является одним из ключевых факторов, индуцирующих ЭМП [5,289]. ЭМП — это процесс,

в ходе которого эпителиальные клетки приобретают мезенхимальные свойства. В нормальных условиях этот процесс играет важную роль в развитии эмбриона и регенерации тканей, однако он также лежит в основе процессов трансформации нормальных клеток в опухолевые и метастазирования опухолей [373]. Проанализировав изменения экспрессии транскрипционных факторов Snail и Slug, которые относят к важнейшим регуляторам ЭМП, мы обнаружили достоверное увеличение уровня экспрессии гена SNAIL в матриксах всех органов: в 3–5 раз в матриксах лёгких, селезёнки, почек и яичников, и в 12 раз — в матриксе печени (рис. 18, Д). При этом, экспрессия гена SLUG не изменялась ни в одном из матриксов (рис. 18, Е). 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 [374,375].

Таким образом, культивирование клеток в ДЦЛ матриксах действительно влияет на работу ряда ключевых генов, ответственных за формирование такого пула фенотипических признаков, как адгезия к матриксу, миграция клеток и инвазия. При этом важно отметить, что изменения экспрессии имеют тканеспецифичный характер.

3.4.2 Динамика экспрессии генов при длительном росте клеток в матриксах различных органов

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. Было обнаружено, что скорость роста, взаиморасположение клеток и структура самого матрикса с течением значительно изменяются (рис. 19).

Через 7 сут культивирования клетки, по-видимому, адаптировались к

условиям матрикса, их количество в большинстве случаев увеличивалось, клетки начинали формировать кластеры. Более детально эта стадия заселения матрикса описана в предыдущих разделах (см. разделы 3.3.1-3.4.1). В этот период, по-видимому, происходят ключевые события, обеспечивающие первичное прикрепление клеток и формирование контактов между клетками и ВКМ.

Через 14 сут культивирования мы наблюдали резкое увеличение количества клеток (рис. 20), причём этот рост отличался для матриксов разных органов. Наиболее сильно количество клеток увеличилось в матриксах печени — в 140 раз. При этом во всех образцах клетки формировали кластеры на местах своего изначального прикрепления и, кроме того, распространялись по матриксным волокнам в глубину матрикса. Целостность матрикса через 14 сут инкубации во всех образцах по-прежнему сохранялась (рис. 19).

Ещё через неделю (21 сут культивирования) было зарегистрировано значительное изменение структуры матрикса, а именно его разрыхление и частичное разрушение. Наиболее сильно деградировали матриксы печени и селезенки. Количество клеток по сравнению с 14 сут во всех матриксах заметно уменьшилось; особенно это было выражено в случае матрикса печени, в котором количество клеток уменьшилось на порядок (рис. 20). Кроме этого, если ранее клетки были относительно равномерно диссеминированы по всей толще матрикса, с преобладающим количеством ближе к центру (область инъекции клеток), то после 21 сут культивирования произошла коллективная миграция клеток к внешним слоям матрикса, что особенно ярко было выражено в матриксах лёгких и почек. Мы предполагаем, что этот процесс может быть связан с уменьшением количества сайтов клеточной адгезии и последующей миграцией клеток в районы с матриксом, сохранившим нативную структуру.

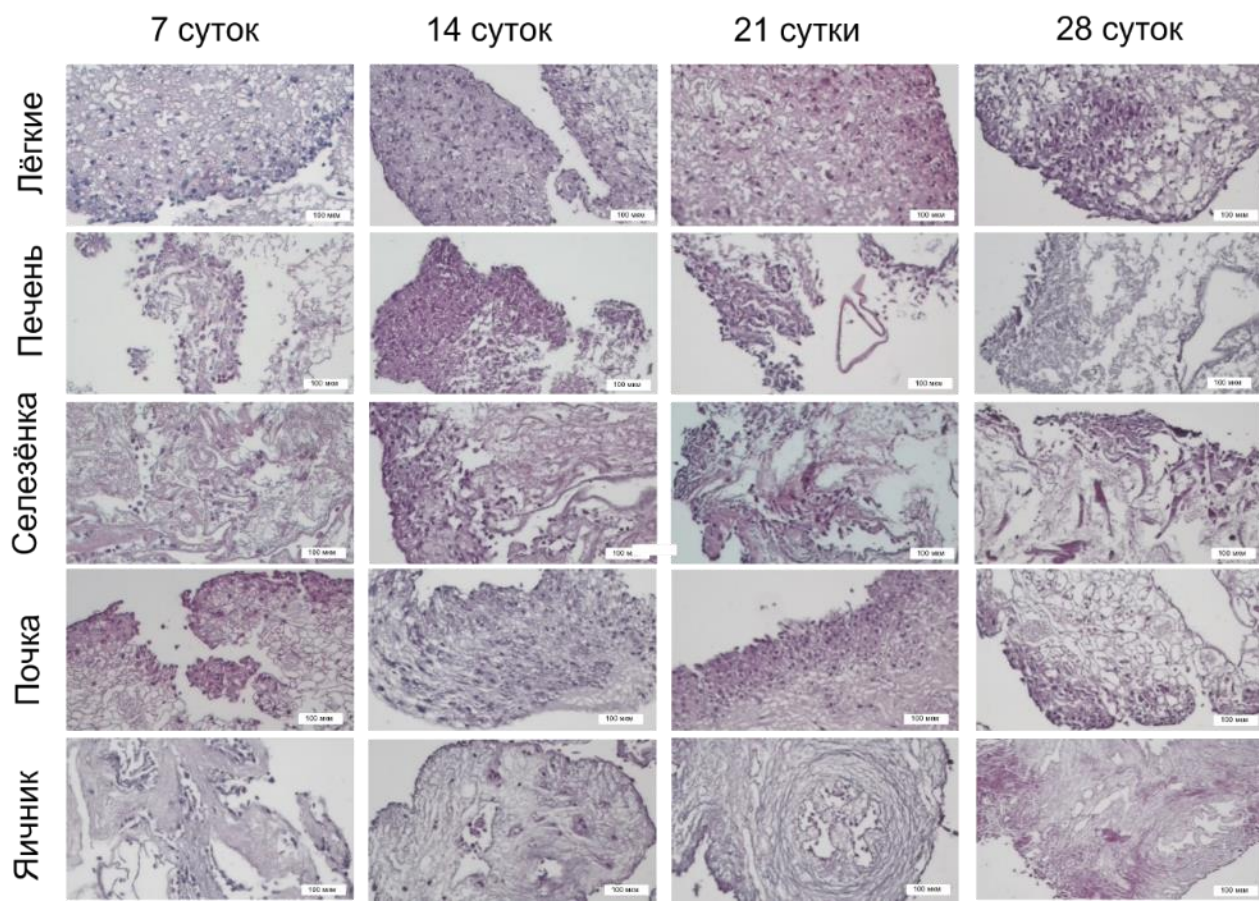


Рис. 19. Гистоморфологический анализ динамики роста клеток MDA-MB-231 в матриксах различных органов в течение 28 сут. Окраска гематоксилин-эозином. Размер линейки 100 мкм

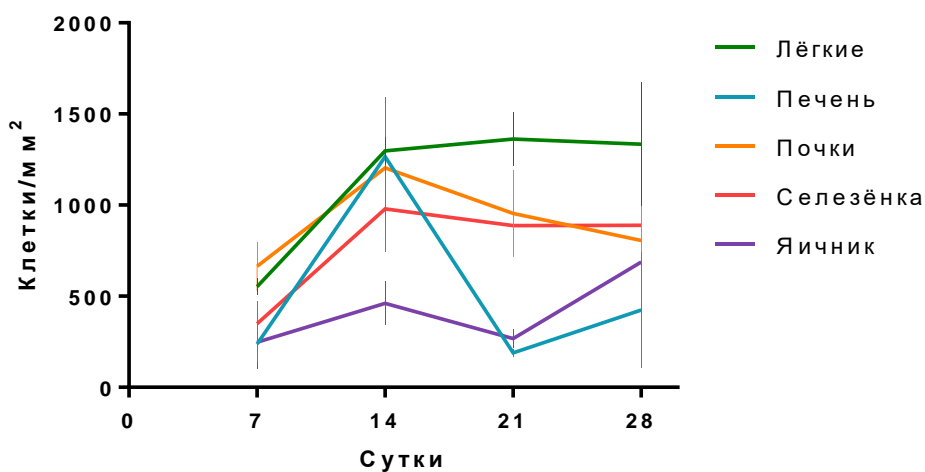


Рис. 20. Количественная оценка роста клеток линии MDA-MB-231 в матриксах разных органов в течение 28 дней

Через 28 сут инкубации матриксы всех органов представляли собой гетерогенную структуру с низким уровнем сохранности основных гистологических структур. Мы наблюдали большое количество ядер клеток и апоптических телец, что свидетельствует о постепенной гибели клеток в матриксах. Скорее всего, это связано с исчерпанием ресурсов и нарушением структуры ВКМ и невозможностью его полноценного ремоделирования в отсутствие резидентных стромальных 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 (табл. 4).

Было обнаружено, что уровень экспрессии гена *DDR1* был достоверно выше по сравнению с монослойной культурой в течение всех 21 сут роста клеток в матриксах всех органов, а в матриксах селезенки и яичника этот повышенный уровень экспрессии сохранялся до 28 сут. Величина экспрессии при этом в матриксах разных органов отличалась. При этом уровень экспрессии *ITGB1* не отличался от уровня экспрессии этого гена в монослое в течение всего исследованного периода.

Изменение экспрессии гена *NOTCH1* в процессе роста клеток в матриксах оказалось более тканеспецифичным. В матриксах яичника, почки и печени уровень экспрессии этого гена существенно повышался через 7 сут после культивации в матриксах, однако затем снижался обратно до уровня монослойной культурой. В клетках, растущих в матриксе селезенки, уровень экспрессии *NOTCH1* был достоверно увеличен в течение всех 28 сут, а в матриксе легкого его уровень экспрессии постоянно колебался.

Таблица 4.

Относительная экспрессия генов в клетках линии MDA-MB-231, культивируемых в матриксах разных органов, по сравнению с монослойной культурой

Время культивации в матриксе	DDR1	ITGB1	MMP9	NOTCH1	SLUG	SNAIL
Печень						
7 сут	0,6± 0,00584*	2,9± 0,00048	2,0± 0,12998	3,2± 0,00263*	3,4± 0,85938	7,7± 0,00403*
14 сут	2,3± 0,00100*	1,1± 0,00002	2,5± 0,01928*	1,4± 0,00171	1,2± 0,05377	2,9± 0,00310
21 сут	15, 2± 0,00758*	0,3± 0,00001	2,6± 0,00805*	9,2± 0,03104	0,7± 0,01918	55,4± 0,03014*
28 сут	0,6± 0,00111	0,5± 0,000003	1,6± 0,02079	1,9± 0,00411	0,7± 0,02074	8,9± 0,00138*
Лёгкие						
7 сут	0,4± 0,00684*	1,5± 0,00014	1,9± 0,05178	1,5± 0,00345*	1,7± 0,11077	2,4± 0,00061*
14 сут	1,1± 0,00216	0,9± 0,00001	4,1± 0,01376*	0,7± 0,00164	0,8± 0,03504	1,3± 0,01541*
21 сут	12,8± 0,00318*	0,3± 0,000004	1,5± 0,01679*	13,0± 0,01340*	0,8± 0,00661	20,0± 0,00238*
28 сут	0,2± 0,00056	0,5± 0,00001	1,7± 0,01568*	1,5± 0,00168	0,8± 0,01538	12,3± 0,00517*
Селезёнка						
7 сут	16,1± 0,01071*	1,2± 0,00058	1,2± 0,01705	1,5± 0,18139*	2,1± 0,14074	3,1± 0,08216*
14 сут	32,1± 0,00566*	0,6± 0,00001	4,5± 0,03688*	10,0± 0,01049*	0,5± 0,00238	12,1± 0,00131*
21 сут	10,9± 0,02495*	0,4± 0,000003	4,7± 0,01044*	4,6± 0,01334*	0,6± 0,02860	5,8± 0,00226*
28 сут	23,8± 0,01459*	0,4± 0,00001	2,5± 0,00062*	4,7± 0,00717*	0,4± 0,01019	11,4± 0,00416*
Почки						
7 сут	14,3± 0,00636*	1,2± 0,00004	1,6± 0,00753	2,3± 0,00313*	1,5± 0,01524	4,0± 0,00032*
14 сут	15,3± 0,00749*	0,6± 0,00001	2,9± 0,00896*	2,0± 0,00185	0,4± 0,00441	2,3± 0,00125
21 сут	18,1± 0,00508*	0,6± 0,00003	2,5± 0,00988*	8,0± 0,02913	0,5± 0,00964	28,6± 0,00698*
28 сут	0,8± 0,00329	0,7± 0,00002	2,1± 0,03232	2,5± 0,00377	0,7± 0,02195	6,6± 0,01217*
Яичники						
7 сут	23,7± 0,00633*	1,3± 0,00006	0,5± 0,00331	11,8± 0,00606*	0,7± 0,00854	4,8± 0,00099*
14 сут	17,2± 0,00146*	0,8± 0,00002	2,0± 0,02343*	6,5± 0,01041	0,5± 0,01066	5,8± 0,00074*
21 сут	12,3± 0,00820*	0,4± 0,00002	3,2± 0,00446*	1,4± 0,00294	0,4± 0,01067	4,7± 0,00177*
28 сут	20,5± 0,01255*	0,4± 0,00002	3,8± 0,02852*	1,3± 0,00235	0,5± 0,02952	3,6± 0,00071*

* — статистически значимое изменение по сравнению с монослоем ($p < 0,05$, ANOVA, критерий Тьюки)

Профиль экспрессии гена MMP9 в матриксах всех органов был сходен: после 7 сут культивирования его уровень экспрессии не отличался от такового в

монослойной культуре, однако начиная с 14 сут он увеличивался, и этот повышенный уровень сохранялся как минимум до 21 сут, а в случае яичника, селезёнки и легких — и до 28 сут. Эти данные хорошо согласуются с результатами гистологического анализа, согласно которому деградация матрикса клетками начинается не сразу, а примерно через 2–3 нед культивирования (рис. 19).

Анализ экспрессии генов SNAIL и SLUG показал, что выводы, сделанные по результатам анализа их экспрессии через 7 сут культивирования, актуальны и для 28 сут. В матриксах всех органов в течение всех 28 сут уровень экспрессии SNAIL по сравнению с монослоем был достоверно повышен, а уровень экспрессии SLUG не изменялся.

Для поисков возможной зависимости между изменением уровня экспрессии исследуемых генов и структурными и биомеханическими параметрами внеклеточного матрикса нами были построены тепловые карты относительной экспрессии генов в клетках MDA-MB-231, культивируемых в матриксах разных органов, на 7, 14, 21 и 28 сут культивации. Полученные тепловые карты были сопоставлены с данными по жёсткости (локальной жёсткости волокон и общей жёсткости трехмерной структуры), размеру пор и диаметру фибрилл матриксов разных органов.

Наиболее выраженная качественная зависимость была выявлена для такого структурного параметра матрикса, как размер пор (рис. 21). В матриксах с наибольшим размером пор значительная по величине 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.

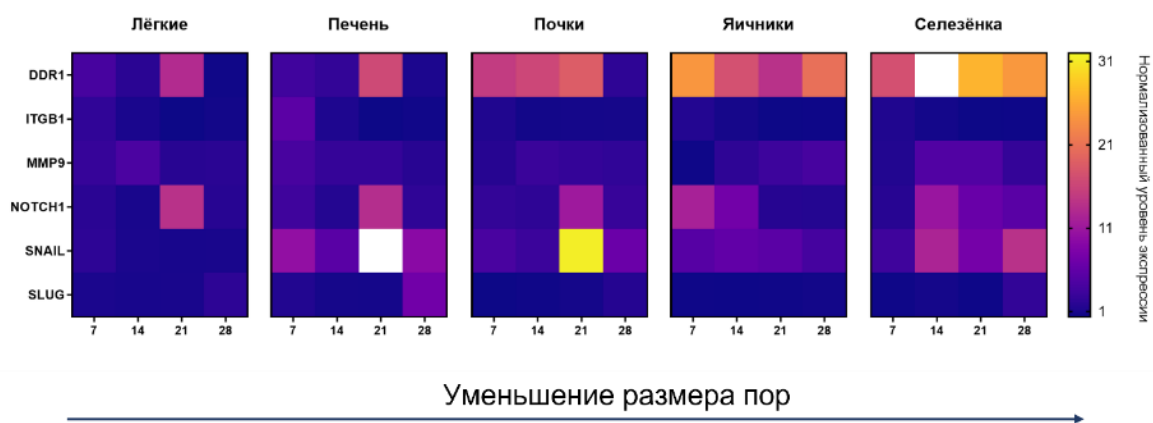


Рис.21. Тепловые карты динамики относительной экспрессии генов в клетках MDA-MB-231, культивируемых в матриксах разных органов на протяжении 28 сут. 7, 14, 21, 28 – количество суток роста клеток в матриксе. Уровень экспрессии в монослое принят за единицу

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 [376]. Мы предполагаем, что уменьшение размера пор сопровождается усилением вынужденного (вследствие пространственного ограничения) взаимодействия клеток с коллагеновыми волокнами матрикса, что приводит к активации рецепторных комплексов с участием дискоидиновых рецепторов [307,377,378]. Этот процесс, в свою очередь, повышает напряжение сдвига для мембранных рецепторов [216], что содействует солокализации мембранного домена Notch с его лигандами и инициирует внутриклеточный

сигнальный путь Notch [379], который активирует свою мишень – транскрипционный фактор Snail [216]. DDR1, в свою очередь, препятствует деградации Snail [380], что приводит к его накоплению и запуску Snail-зависимых транскрипционных программ [374]. 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 [381,382]. 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 [28,383].

Для подтверждения гипотезы о возможности взаимосвязанного участия исследованных генов в матрикс-ассоциированной сигнальной сети нами был проведён кластерный анализ (рис. 22). Согласно результатам анализа, самая выраженная взаимосвязь показана для пары DDR1 и NOTCH1. По данным литературы оба эти рецептора могут участвовать в индукции пролиферацию опухолевых клеток, в том числе путем регуляции митоген-активируемых генов. В некоторых случаях рецептор DDR1 может усиливать активность сигнального пути Notch1 [376,384]. Кроме этого, оба эти гена могут участвовать в регуляции способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию путем индукции ЭМП или его активации [376,385]. В этом случае оба этих рецептора могут приводить к активации Snail как прямым, так и косвенным образом. Такая связь также подтверждается результатами кластерного анализа (рис. 22).

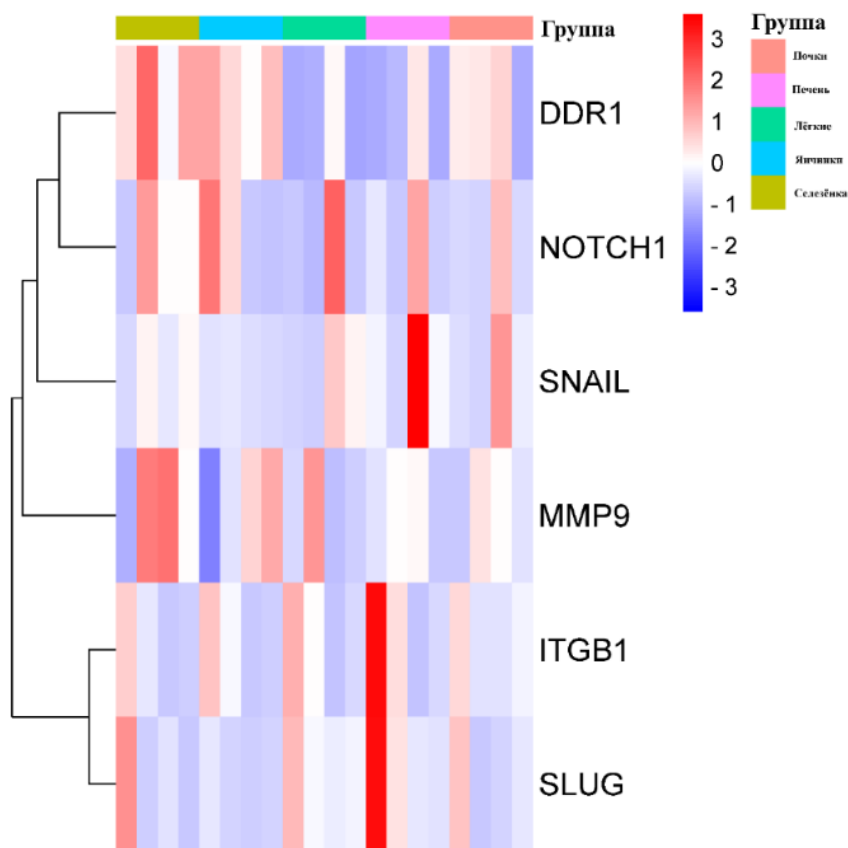


Рис. 22. Тепловая карта и результаты кластерного анализа относительной экспрессии генов в клетках MDA-MB-231, культивируемых в матриксах разных органов на протяжении 28 сут. Кластерный анализ выполнен с помощью программы SRPlot (алгоритм кластеризации — метод полной связи; мера расстояния — евклидово расстояние) Статистический анализ приведён в табл. 4.

Таким образом, было показано, что рост клеток в матриксах сопровождается динамическим изменением экспрессии генов рецепторов DDR1 и Notch1, а также транскрипционного фактора Snail. Увеличение экспрессии этих генов, по-видимому, связано с особенностями структуры матрикса, в частности, показана логически непротиворечивая связь временного паттерна активации указанных генов с размером пор матрикса. Стоит также отметить, что нами были обнаружены тканеспецифичные изменения экспрессии гена металлопротеазы MMP9, что согласуется с распространённым представлением о роли этого фермента во взаимодействии опухолевых клеток с внеклеточным матриксом.

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 [386,387]. Внеклеточный матрикс представляет собой трехмерную сеть, которая в основном состоит из макромолекул, таких как коллаген, фибронектин, ламинин, эластин, протеогликаны и гликопротеины, которые обеспечивают структурную и биохимическую поддержку клетки [59]. Во время прогрессирования большинства опухолей ремоделирование матрикса приводит к изменению его структурных и биомеханических свойств, что оказывает влияние на поведение клеток на клеточном и молекулярном уровне посредством механосенсорных путей [388]. В настоящее время показано, что структурные и биомеханические свойства матрикса могут играть важную роль в таких процессах как автономность и неограниченный рост опухоли [16]; резистентность к ингибиторам роста [16]; уход клеток от апоптоза [389]; их неограниченный репликативный потенциал [390]; тканевую инвазию и метастазирование опухоли [19].

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 матриц 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 [391]. Также мы оценили общую жесткость трехмерной структуры полученных ДЦЛ матриц 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 биологических тканей сильно различаются, что затрудняет их сопоставление (табл. 5). По всей видимости, вариабельность экспериментально полученных значений обусловлена использованием принципиально разных подходов, а также техническими условиями измерения, например, проведением испытаний на растяжение или сжатие, использованием различных инденторов и различных скоростей измерений. Мы считаем, что совпадение порядков жёсткости, полученных в нашей работе и описанных в литературе [392,393] может служить дополнительным признаком высокой сохранности структуры матрикса при использовании предложенного протокола децеллюляризации.

Таблица 5.

Модули Юнга различных ДЦЛ органов, измеренных разными методами

ДЦЛ орган	Модуль Юнга, кПа	Метод	Прибор и условия измерения	Ссылка
Печень свиньи	1.25 ± 0.07	Сжатие	Испытательная машина Zwick/Roell ProLine Z005 (Zwick/Roell, Ульм, Германия), оснащенная датчиком нагрузки 10 Н	[394]
Печень хорька	1.18	Сжатие	Система механических испытаний на стенде ElectroForce, оснащенная датчиком нагрузки весом 1000 г (Bose ElectroForce, Эден-Прери, Миннесота, США)	[395]
Печень крысы	145 ± 19.68	Растяжение	Машина для испытания на одноосное растяжение (CMT8502, Shenzhen New Sans Test Technical Company, Наньшань, Шэньчжэнь, Китай). Испытание проводилось при скорости нагрузки 1 мм/мин до окончательного разрушения образца	[396]
Печень человека	$18,490 \pm 1400$	Растяжение	Универсальная испытательная система Instron 3367 с двумя колоннами (Instron, Glenview, IL, США), оснащенная погружными пневматическими захватами бокового действия Instron biopulse (Instron, США) и датчиком нагрузки 50 Н. Использовали калибр длиной 20 мм и скорость удлинения 20 мм/мин	[397]
Лёгкое крысы	~80	Растяжение	Машина для испытания на растяжение Santam STM-1 (САНТАМ, Тегеран, Иран). Испытание на одноосное растяжение проводили при скорости траверсы 2 мм/мин, относительное удлинение 20-40 мм, и нагрузочном датчике весом 6 кг при постоянной скорости удлинения до тех пор, пока не наблюдалось разрушение образца	[398]
Лёгкое крысы	74.91 ± 5.78	Растяжение	Машина для испытания материалов BZ2.5/TN1S (Цвик/Роэлл, Ульм, Германия). Предварительная нагрузка в 0,015 Н	[399]
Лёгкое крысы	0.38 ± 0.07	Растяжение	Привод перемещения 300C-LR (Aurora Scientific, Аврора, Онтарио, Канада) с датчиком усилия 404A (Aurora Scientific, Канада). Измерения одноосного растяжения после предварительной подготовки при 0,1 Н	[391]
Почка свиньи (капсула)	6.4 ± 2.7	Сжатие	Одноклоночная универсальная испытательная система Instron 3342 (Instron, США) и Instron Model 1321 (Instron, Гленвью, Иллинойс, США) использовались для проведения испытаний на сжатие со скоростью 0,07 мм/сек до тех пор, пока не было достигнуто усилие сжатия 45 Н	[400]
Почка крысы	178.9 ± 50.2	Растяжение	Машина для механических испытаний на растяжение (Instron, Гленвью, Иллинойс, США). Образцы были предварительно подготовлены циклами загрузки и разгрузки. Скорость деформации составляла $0,01 \text{ с}^{-1}$ на протяжении всего испытания	[401]
Лёгкие крысы	4242.2 ± 891.6			
Печень крысы	233.6 ± 98.0			

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% [402]. При этом локализация метастазов зависит от генетического/метаболического профиля опухоли [378,403,404]. 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 [405-407]. В нашей работе мы проанализировали наличие тканеспецифичности при репопуляции клетками рака молочной железы ДЦЛ матриксов с различными свойствами. Для исследования особенностей роста клеток в матриксах нами были выбраны две линии аденокарциномы молочной железы человека, MDA-MB-231 и SKBR3. Линия MDA-MB-231 относится к трижды отрицательному типу рака молочной железы, с низкой степенью дифференцировки. Линия SKBR3, в свою очередь, представляет собой высокодифференцированный HER-2 позитивный рак [365,408]. 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 [409,410]. 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 [411]. В свою очередь, клетки SKBR-3, имеющие эпителиальный фенотип, более

успешно растут в матриксах с низкой локальной жесткостью матричных 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 [412,413].

Зависимость пролиферации и фенотипа клеток MDA-MB-231 от биомеханических свойств матрикса ранее была получена в работах других научных групп. В частности, при использовании опухолевого ДЦЛ матрикса увеличение жесткости не влияло на скорость роста и морфологию клеточной линии MDA-MB-231, но приводило к развитию лекарственной устойчивости [24]. 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, что сходно с результатами, полученными на 2D-моделях [414]. Также было показано, что клетки линии MDA-MB-231 лучше растут в более жестком возрастном матриксе молочной железы по сравнению с более молодым мягким [21]. Несмотря на кажущееся противоречие, эти результаты согласуются с нашими: максимальные значения жесткости матрикса молочной железы достигают около 2 кПа, что близко к жесткости матрикса легкого, который, как показано в нашей работе, лучше всего заселяется клетками. Принимая во внимание высокую скорость роста и изменение морфологии клеток линии MDA-MB-231 в матриксе кости, описанные Shah et al., а также приоритетность костной ткани, как мишени при метастазировании рака молочной железы, можно предположить, что существует несколько оптимальных диапазонов жесткости, которые влияют на фенотипические параметры клеток с помощью разных механизмов.

Влияние ВКМ на клетки рака молочной железы не ограничивается регуляцией скорости пролиферации и особенностями инвазии в ткань. Нами была показана тканеспецифическая экспрессия генов ряда белков, связанных с

рецепцией матрикса, его ремоделированием, а также эпителиально-мезенхимальный переход, 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 [195,415]. Эти процессы, взаимодействуя между собой, формируют сложную сеть сигнальных путей, в которой участвуют мембранные рецепторы, ядерная оболочка и гены-мишени [307,382]. 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 [416-418].

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 основной 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 жесткости 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 ММР9, однако значимой корреляции с исследованными параметрами матрикса обнаружено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 97 – P. 4-27.
2. Walma D.A.C., Yamada K.M. The extracellular matrix in development // *Development*. – 2020. – Vol. 147(10). – P. dev175596.
3. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2014. – Vol. 15(12). – P. 786-801.
4. Vasudevan J., Jiang K., Fernandez J.G., Lim C.T. Extracellular matrix mechanobiology in cancer cell migration // *Acta Biomater*. – 2023. – Vol. 163 – P. 351-364.
5. Pickup M., Mouw J., Weaver V. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer // *EMBO reports*. – 2014. – Vol. 15 – P. 1243–1253.
6. Kai F., Drain A.P., Weaver V.M. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey // *Developmental Cell*. – 2019. – Vol. 49(3). – P. 332-346.
7. Yuan Y., Guo Y., Guo Z.W., Hao H.F., Jiao Y.N., Deng X.X., Han S.Y. *Marsdenia tenacissima* extract induces endoplasmic reticulum stress-associated immunogenic cell death in non-small cell lung cancer cells through targeting AXL // *J Ethnopharmacol*. – 2023. – Vol. 314 – P. 116620.
8. Kanchanawong P., Shtengel G., Pasapera A.M., Ramko E.B., Davidson M.W., Hess H.F., Waterman C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions // *Nature*. – 2010. – Vol. 468(7323). – P. 580-584.
9. Leitinger B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2014. – Vol. 310 – P. 39-87.
10. Zhang Z., Gu Y., Su X., Bai J., Guan W., Ma J., Luo J., He J., Zhang B., Geng M.; et al. Co-Occurring Alteration of NOTCH and DDR Pathways Serves as Novel Predictor to Efficacious Immunotherapy in NSCLC // *Front Oncol*. – 2021. – Vol. 11 – P. 659321.
11. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giulitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. – 2013. – Vol. 154(5). – P. 1047-1059.
12. Moreno-Layseca P., Streuli C.H. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression // *Matrix Biol*. – 2014. – Vol. 34 – P. 144-153.
13. Kretschmer M., Mamistvalov R., Sprinzak D., Vollmar A.M., Zahler S. Matrix stiffness regulates Notch signaling activity in endothelial cells // *J Cell Sci*. – 2023. – Vol. 136(2). – P. jcs260442.

14. Zanotelli M.R., Zhang J., Reinhart-King C.A. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis // *Cell Metab.* – 2021. – Vol. 33(7). – P. 1307-1321.
15. Reuten R., Mayorca-Guiliani A.E., Erler J.T. Matritecture: Mapping the extracellular matrix architecture during health and disease // *Matrix Biol Plus.* – 2022. – Vol. 14 – P. 100102.
16. Fan Y., Sun Q., Li X., Feng J., Ao Z., Li X., Wang J. Substrate Stiffness Modulates the Growth, Phenotype, and Chemoresistance of Ovarian Cancer Cells // *Frontiers in cell and developmental biology.* – 2021. – Vol. 9 – P. 718834.
17. Shen Q., Reedijk M. Notch Signaling and the Breast Cancer Microenvironment // *Adv Exp Med Biol.* – 2021. – Vol. 1287 – P. 183-200.
18. Wei X., Lou H., Zhou D., Jia Y., Li H., Huang Q., Ma J., Yang Z., Sun C., Meng Y.; et al. TAGLN mediated stiffness-regulated ovarian cancer progression via RhoA/ROCK pathway // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2021. – Vol. 40(1). – P. 292.
19. Nia H.T., Munn L.L., Jain R.K. Physical traits of cancer // *Science.* – 2020. – Vol. 370(6516). – P. eaaz0868.
20. Liu B., Kilpatrick J.I., Lukasz B., Jarvis S.P., McDonnell F., Wallace D.M., Clark A.F., O'Brien C.J. Increased Substrate Stiffness Elicits a Myofibroblastic Phenotype in Human Lamina Cribrosa Cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2018. – Vol. 59(2). – P. 803-814.
21. Melica M.E., La Regina G., Parri M., Peired A.J., Romagnani P., Lasagni L. Substrate Stiffness Modulates Renal Progenitor Cell Properties via a ROCK-Mediated Mechanotransduction Mechanism // *Cells.* – 2019. – Vol. 8(12). – P. 1561.
22. Choudhury D., Yee M., Sheng Z.L.J., Amirul A., Naing M.W. Decellularization systems and devices: State-of-the-art // *Acta biomaterialia.* – 2020. – Vol. 115 – P. 51-59.
23. 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. – Vol. 7(4). – P. 13-21.
24. Lv Y., Wang H., Li G., Zhao B. Three-dimensional decellularized tumor extracellular matrices with different stiffness as bioengineered tumor scaffolds // *Bioactive materials.* – 2021. – Vol. 6(9). – P. 2767-2782.
25. van Tienderen G.S., Conboy J., Muntz I., Willemse J., Tieleman J., Monfils K., Schurink I.J., Demmers J.A.A., Doukas M., Koenderink G.H.; et al. Tumor decellularization reveals proteomic and mechanical characteristics of the

- extracellular matrix of primary liver cancer // *Biomater Adv.* – 2023. – Vol. 146 – P. 213289.
26. Wilcox H.E., Korossis S.A., Booth C., Watterson K.G., Kearney J.N., Fisher J., Ingham E. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix // *The Journal of heart valve disease.* – 2005. – Vol. 14(2). – P. 228-236; discussion 236-227.
 27. Vukadinovic-Nikolic Z., Andréé B., Dorfman S.E., Pflaum M., Horvath T., Lux M., Venturini L., Bär A., Kensah G., Lara A.R.; et al. Generation of bioartificial heart tissue by combining a three-dimensional gel-based cardiac construct with decellularized small intestinal submucosa // *Tissue engineering. Part A.* – 2014. – Vol. 20(3-4). – P. 799-809.
 28. Lv Y., Chen C., Zhao B., Zhang X. Regulation of matrix stiffness on the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells under hypoxia environment // *Naturwissenschaften.* – 2017. – Vol. 104(5-6). – P. 38.
 29. Lai C.-J., Lin C.-Y., Liao W.-Y., Hour T.-C., Wang H.-D., Chuu C.-P. CD44 Promotes Migration and Invasion of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Likely via Induction of Hippo-Yap Signaling // *Cells.* – 2019. – Vol. 8 – P. 295.
 30. SenGupta S., Parent C.A., Bear J.E. The principles of directed cell migration // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2021. – Vol. 22(8). – P. 529-547.
 31. Bandzerewicz A., Gadomska-Gajadhur A. Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms // *Cells.* – 2022. – Vol. 11(5). – P. 914.
 32. Hayward M.K., Muncie J.M., Weaver V.M. Tissue mechanics in stem cell fate, development, and cancer // *Dev Cell.* – 2021. – Vol. 56(13). – P. 1833-1847.
 33. Schiller H.B., Fässler R. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions // *EMBO Rep.* – 2013. – Vol. 14(6). – P. 509-519.
 34. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science.* – 2009. – Vol. 326(5957). – P. 1216-1219.
 35. McKee T.J., Perlman G., Morris M., Komarova S.V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9(1). – P. 10542.
 36. Shaw T.J., Rognoni E. Dissecting Fibroblast Heterogeneity in Health and Fibrotic Disease // *Curr Rheumatol Rep.* – 2020. – Vol. 22(8). – P. 33.
 37. Cambi A., Chavrier P. Tissue remodeling by invadosomes // *Fac Rev.* – 2021. – Vol. 10 – P. 39.
 38. Raskov H., Gaggar S., Tajik A., Orhan A., Gögenur I. The Matrix Reloaded—The Role of the Extracellular Matrix in Cancer // *Cancers.* – 2023. – Vol. 15(7).

- P. 2057.
39. Barnes M. Update on Collagens: What You Need to Know and Consider // *Plast Surg Nurs.* – 2019. – Vol. 39(4). – P. 112-115.
 40. Shaw L.M., Olsen B.R. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices // *Trends Biochem Sci.* – 1991. – Vol. 16(5). – P. 191-194.
 41. Mienaltowski M.J., Birk D.E. Structure, physiology, and biochemistry of collagens // *Adv Exp Med Biol.* – 2014. – Vol. 802 – P. 5-29.
 42. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins // *Bioessays.* – 2007. – Vol. 29(10). – P. 1001-1010.
 43. Le Borgne-Rochet M., Angevin L., Bazellières E., Ordas L., Comunale F., Denisov E.V., Tashireva L.A., Perelmuter V.M., Bièche I., Vacher S.; et al. P-cadherin-induced decorin secretion is required for collagen fiber alignment and directional collective cell migration // *J Cell Sci.* – 2019. – Vol. 132(21). – P. jcs233189.
 44. Mathew-Steiner S.S., Roy S., Sen C.K. Collagen in Wound Healing // *Bioengineering.* – 2021. – Vol. 8(5). – P. 63.
 45. Cocciolone A.J., Hawes J.Z., Staiculescu M.C., Johnson E.O., Murshed M., Wagenseil J.E. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2018. – Vol. 315(2). – P. H189-h205.
 46. Baldwin A.K., Simpson A., Steer R., Cain S.A., Kielty C.M. Elastic fibres in health and disease // *Expert Rev Mol Med.* – 2013. – Vol. 15 – P. e8.
 47. Thomson J., Singh M., Eckersley A., Cain S.A., Sherratt M.J., Baldock C. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors // *Semin Cell Dev Biol.* – 2019. – Vol. 89 – P. 109-117.
 48. Ritty T.M., Ditsios K., Starcher B.C. Distribution of the elastic fiber and associated proteins in flexor tendon reflects function // *Anat Rec.* – 2002. – Vol. 268(4). – P. 430-440.
 49. Rozario T., DeSimone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Dev Biol.* – 2010. – Vol. 341(1). – P. 126-140.
 50. Lindahl U. A personal voyage through the proteoglycan field // *Matrix Biol.* – 2014. – Vol. 35 – P. 3-7.
 51. Ghiselli G. Drug-Mediated Regulation of Glycosaminoglycan Biosynthesis // *Med Res Rev.* – 2017. – Vol. 37(5). – P. 1051-1094.
 52. Walimbe T., Panitch A. Proteoglycans in Biomedicine: Resurgence of an Underexploited Class of ECM Molecules // *Frontiers in Pharmacology.* – 2020.

- Vol. 10 – P. 1661.
53. Elfenbein A., Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance // *J Cell Sci.* – 2013. – Vol. 126(Pt 17). – P. 3799-3804.
 54. Kolset S.O., Tveit H. Serglycin--structure and biology // *Cell Mol Life Sci.* – 2008. – Vol. 65(7-8). – P. 1073-1085.
 55. Whitelock J.M., Graham L.D., Melrose J., Murdoch A.D., Iozzo R.V., Underwood P.A. Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells // *Matrix Biol.* – 1999. – Vol. 18(2). – P. 163-178.
 56. Zhang P., Yang L., Li G., Jin Y., Wu D., Wang Q.M., Huang P. Agrin Involvement in Synaptogenesis Induced by Exercise in a Rat Model of Experimental Stroke // *Neurorehabil Neural Repair.* – 2020. – Vol. 34(12). – P. 1124-1137.
 57. Jan A.T., Lee E.J., Choi I. Fibromodulin: A regulatory molecule maintaining cellular architecture for normal cellular function // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2016. – Vol. 80 – P. 66-70.
 58. Davis B.G. Synthesis of glycoproteins // *Chem Rev.* – 2002. – Vol. 102(2). – P. 579-602.
 59. Mouw J.K., Ou G., Weaver V.M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2014. – Vol. 15(12). – P. 771-785.
 60. Gupta S.K. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans // *J Reprod Immunol.* – 2015. – Vol. 108 – P. 90-97.
 61. Jamieson J.C., Kaplan H.A., Woloski B.M., Hellman M., Ham K. Glycoprotein biosynthesis during the acute-phase response to inflammation // *Can J Biochem Cell Biol.* – 1983. – Vol. 61(9). – P. 1041-1048.
 62. Weeterings C., Adelmeijer J., Myles T., de Groot P.G., Lisman T. Glycoprotein Ibalph-mediated platelet adhesion and aggregation to immobilized thrombin under conditions of flow // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2006. – Vol. 26(3). – P. 670-675.
 63. Preissner K.T., Reuning U. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein // *Semin Thromb Hemost.* – 2011. – Vol. 37(4). – P. 408-424.
 64. Singh P., Carraher C., Schwarzbauer J.E. Assembly of fibronectin extracellular matrix // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2010. – Vol. 26 – P. 397-419.
 65. Mao Y., Schwarzbauer J.E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process // *Matrix Biol.* – 2005. – Vol. 24(6). – P. 389-399.

66. To W.S., Midwood K.S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair // *Fibrogenesis Tissue Repair*. – 2011. – Vol. 4 – P. 21.
67. Maurer L.M., Ma W., Mosher D.F. Dynamic structure of plasma fibronectin // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. – 2015. – Vol. 51(4). – P. 213-227.
68. McKee K.K., Hohenester E., Aleksandrova M., Yurchenco P.D. Organization of the laminin polymer node // *Matrix Biol*. – 2021. – Vol. 98 – P. 49-63.
69. Sasaki T., Fässler R., Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly // *J Cell Biol*. – 2004. – Vol. 164(7). – P. 959-963.
70. Timpl R., Sasaki T., Kostka G., Chu M.-L. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2003. – Vol. 4(6). – P. 479-489.
71. Chiquet-Ehrismann R., Tucker R.P. Tenascins and the importance of adhesion modulation // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – Vol. 3(5). – P. 1-19.
72. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin // *Adv Protein Chem*. – 2005. – Vol. 70 – P. 247-299.
73. Leavesley D.I., Kashyap A.S., Croll T., Sivaramakrishnan M., Shokoohmand A., Hollier B.G., Upton Z. Vitronectin--master controller or micromanager? // *IUBMB Life*. – 2013. – Vol. 65(10). – P. 807-818.
74. Rosset E.M., Bradshaw A.D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue // *Matrix Biol*. – 2016. – Vol. 52-54 – P. 78-87.
75. Ganss B., Kim R.H., Sodek J. Bone sialoprotein // *Crit Rev Oral Biol Med*. – 1999. – Vol. 10(1). – P. 79-98.
76. Fatemi S.H. Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease // *Mol Psychiatry*. – 2005. – Vol. 10(3). – P. 251-257.
77. Sicari B.M., Londono R., Badylak S.F. Chapter 5 - Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering. In *Tissue Engineering (Second Edition)*, Blitterswijk, C.A.V., De Boer, J., Eds.; Academic Press: Oxford, 2014; pp. 149-175.
78. Hayrapetyan L., Sarvazyan N. Extracellular Matrix and Adhesion Molecules. In *Tissue Engineering: Principles, Protocols, and Practical Exercises*, Sarvazyan, N., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 29-38.
79. Brown B., Lindberg K., Reing J., Stolz D.B., Badylak S.F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix // *Tissue Eng*. – 2006. – Vol. 12(3). – P. 519-526.
80. Gong J., Sagiv O., Cai H., Tsang S.H., Del Priore L.V. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into

- retinal or retinal pigment epithelial progenitors // *Exp Eye Res.* – 2008. – Vol. 86(6). – P. 957-965.
81. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 23 Suppl – P. S17-26.
 82. Cartmell J.S., Dunn M.G. Development of cell-seeded patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction // *Tissue Eng.* – 2004. – Vol. 10(7-8). – P. 1065-1075.
 83. Sacks M.S., Gloeckner D.C. Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa // *J Biomed Mater Res.* – 1999. – Vol. 46(1). – P. 1-10.
 84. Gilbert T.W., Sacks M.S., Grashow J.S., Woo S.L., Badylak S.F., Chancellor M.B. Fiber kinematics of small intestinal submucosa under biaxial and uniaxial stretch // *J Biomech Eng.* – 2006. – Vol. 128(6). – P. 890-898.
 85. Gilbert T.W., Wognum S., Joyce E.M., Freytes D.O., Sacks M.S., Badylak S.F. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29(36). – P. 4775-4782.
 86. Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues // *J Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125(Pt 13). – P. 3015-3024.
 87. Levental I., Georges P.C., Janmey P.A. Soft biological materials and their impact on cell function // *Soft Matter.* – 2007. – Vol. 3(3). – P. 299-306.
 88. Писаренко Г.С., Агарев В.А., Квитка А.Л., Попков В.Г., Уманский Е.С. Сопротивление материалов. М.: Высшая школа, 1993. 655 с.
 89. Fratzl P. Collagen: structure and mechanics; Springer: New York, 2008; p. 506
 90. Grosberg A.Y., Khokhlov A.R., Stanley H.E., Mallinckrodt A.J., McKay S. Statistical Physics of Macromolecules // *Computer in Physics.* – 1995. – Vol. 9(2). – P. 171-172.
 91. Wagenseil J.E., Mecham R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics // *Physiol Rev.* – 2009. – Vol. 89(3). – P. 957-989.
 92. Akhmanova M., Osidak E., Domogatsky S., Rodin S., Domogatskaya A. Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of *In Vivo* Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research // *Stem Cells International.* – 2015. – Vol. 2015 – P. 167025.
 93. Тухфатуллин А.Б., Самсонова Р.И., Путеева Л.Е. Строительная механика. Расчет статически неопределимых систем. М.: Издательство Юрайт, 2021.

155 с.

94. Иванов С.А., Нефедов А.В., Чиченев Н. А. Проектирование и оптимизация конструкций машин и оборудования. Учебник. Новотроицк: Новотроицкий филиал "МИСиС", 2014. 200 с.
95. Сапунов В.Т. Прикладная теория упругости: Учебное пособие. М.: МИФИ, 2008. 232 с.
96. Poole J.J.A., Mostaço-Guidolin L.B. Optical Microscopy and the Extracellular Matrix Structure: A Review // *Cells*. – 2021. – Vol. 10(7). – P.
97. Дарков А.В., Шпиро Г.С. Сопротивление материалов: учебник для студентов высших учебных заведений. М.: Альянс, 1989. 622 с.
98. Mayorca-Guiliani A.E., Rafeeva M., Willacy O., Madsen C.D., Reuten R., Erler J.T. Decellularization of the Murine Cardiopulmonary Complex // *Journal of visualized experiments: JoVE*. – 2021. – Vol. (171). – P. e61854.
99. Cailleau R., Olivé M., Cruciger Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization // *In vitro*. – 1978. – Vol. 14(11). – P. 911-915.
100. Butcher D.T., Alliston T., Weaver V.M. A tense situation: forcing tumour progression // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – Vol. 9(2). – P. 108-122.
101. Akhmanova M., Osidak E., Domogatsky S., Rodin S., Domogatskaya A. Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research // *Stem Cells Int*. – 2015. – Vol. 2015 – P. 167025.
102. Chaudhuri O., Cooper-White J., Janmey P.A., Mooney D.J., Shenoy V.B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour // *Nature*. – 2020. – Vol. 584(7822). – P. 535-546.
103. DuFort C.C., Paszek M.J., Weaver V.M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2011. – Vol. 12(5). – P. 308-319.
104. Schedin P., Keely P.J. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – Vol. 3(1). – P. a003228.
105. Elosegui-Artola A., Trepats X., Roca-Cusachs P. Control of Mechanotransduction by Molecular Clutch Dynamics // *Trends Cell Biol*. – 2018. – Vol. 28(5). – P. 356-367.
106. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification // *Cell*. – 2006. – Vol. 126(4). – P. 677-689.
107. Doyle A.D., Carvajal N., Jin A., Matsumoto K., Yamada K.M. Local 3D matrix

- microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions // *Nat Commun.* – 2015. – Vol. 6 – P. 8720.
108. Goenka A., Khan F., Verma B., Sinha P., Dmello C.C., Jogalekar M.P., Gangadaran P., Ahn B.C. Tumor microenvironment signaling and therapeutics in cancer progression // *Cancer Commun (Lond).* – 2023. – Vol. 43(5). – P. 525-561.
 109. Hohenester E. Signalling complexes at the cell-matrix interface // *Curr Opin Struct Biol.* – 2014. – Vol. 29 – P. 10-16.
 110. Bouvard D., Pouwels J., De Franceschi N., Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2013. – Vol. 14(7). – P. 430-442.
 111. Hynes R.O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective // *Matrix Biol.* – 2004. – Vol. 23(6). – P. 333-340.
 112. Tiwari S., Askari J.A., Humphries M.J., Balleid N.J. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking // *J Cell Sci.* – 2011. – Vol. 124(Pt 10). – P. 1672-1680.
 113. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119(Pt 19). – P. 3901-3903.
 114. Ivaska J., Heino J. Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2011. – Vol. 27 – P. 291-320.
 115. Gasparski A.N., Beningo K.A. Mechanoreception at the cell membrane: More than the integrins // *Arch Biochem Biophys.* – 2015. – Vol. 586 – P. 20-26.
 116. Ramovs V., Te Molder L., Sonnenberg A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer // *Matrix Biol.* – 2017. – Vol. 57-58 – P. 213-243.
 117. Li J., Peng L., Chen Q., Ye Z., Zhao T., Hou S., Gu J., Hang Q. Integrin $\beta 1$ in Pancreatic Cancer: Expressions, Functions, and Clinical Implications // *Cancers.* – 2022. – Vol. 14(14). – P. 3377.
 118. Rognoni E., Ruppert R., Fässler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease // *J Cell Sci.* – 2016. – Vol. 129(1). – P. 17-27.
 119. Ripamonti M., Wehrle-Haller B., de Curtis I. Paxillin: A Hub for Mechano-Transduction from the $\beta 3$ Integrin-Talin-Kindlin Axis // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 10 – P. 852016.
 120. Georgiadou M., Ivaska J. Tensins: Bridging AMP-Activated Protein Kinase with Integrin Activation // *Trends Cell Biol.* – 2017. – Vol. 27(10). – P. 703-711.
 121. Horton E.R., Byron A., Askari J.A., Ng D.H.J., Millon-Frémillon A., Robertson

- J., Koper E.J., Paul N.R., Warwood S., Knight D.; et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly // *Nat Cell Biol.* – 2015. – Vol. 17(12). – P. 1577-1587.
122. Hamidi H., Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis // *Nat Rev Cancer.* – 2018. – Vol. 18(9). – P. 533-548.
 123. Alanko J., Mai A., Jacquemet G., Schauer K., Kaukonen R., Saari M., Goud B., Ivaska J. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis // *Nature Cell Biology.* – 2015. – Vol. 17(11). – P. 1412-1421.
 124. Nader G.P., Ezratty E.J., Gundersen G.G. FAK, talin and PIPKI γ regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly // *Nat Cell Biol.* – 2016. – Vol. 18(5). – P. 491-503.
 125. McNally K.E., Faulkner R., Steinberg F., Gallon M., Ghai R., Pim D., Langton P., Pearson N., Danson C.M., Nägele H.; et al. Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling // *Nature Cell Biology.* – 2017. – Vol. 19(10). – P. 1214-1225.
 126. Morimatsu M., Mekhdjian A.H., Adhikari A.S., Dunn A.R. Molecular tension sensors report forces generated by single integrin molecules in living cells // *Nano Lett.* – 2013. – Vol. 13(9). – P. 3985-3989.
 127. Chang A.C., Mekhdjian A.H., Morimatsu M., Denisin A.K., Pruitt B.L., Dunn A.R. Single Molecule Force Measurements in Living Cells Reveal a Minimally Tensioned Integrin State // *ACS Nano.* – 2016. – Vol. 10(12). – P. 10745-10752.
 128. Garcia-Manyes S., Beedle A. Steering chemical reactions with force // *Nature Reviews Chemistry.* – 2017. – Vol. 1 – P. s41570-41017.
 129. Roca-Cusachs P., del Rio A., Puklin-Faucher E., Gauthier N.C., Biais N., Sheetz M.P. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110(15). – P. E1361-1370.
 130. Brockman J.M., Blanchard A.T., Pui-Yan V.M., Derricotte W.D., Zhang Y., Fay M.E., Lam W.A., Evangelista F.A., Mattheyses A.L., Salaita K. Mapping the 3D orientation of piconewton integrin traction forces // *Nat Methods.* – 2018. – Vol. 15(2). – P. 115-118.
 131. Swaminathan V., Kalappurakkal J.M., Mehta S.B., Nordenfelt P., Moore T.I., Koga N., Baker D.A., Oldenbourg R., Tani T., Mayor S.; et al. Actin retrograde flow actively aligns and orients ligand-engaged integrins in focal adhesions // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 114(40). – P. 10648-10653.
 132. Pasapera A.M., Schneider I.C., Rericha E., Schlaepfer D.D., Waterman C.M. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through

- FAK-mediated paxillin phosphorylation // *J Cell Biol.* – 2010. – Vol. 188(6). – P. 877-890.
133. Plotnikov Sergey V., Pasapera Ana M., Sabass B., Waterman Clare M. Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration // *Cell.* – 2012. – Vol. 151(7). – P. 1513-1527.
 134. Guilluy C., Swaminathan V., Garcia-Mata R., O'Brien E.T., Superfine R., Burridge K. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins // *Nat Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13(6). – P. 722-727.
 135. Paszek M.J., Zahir N., Johnson K.R., Lakins J.N., Rozenberg G.I., Gefen A., Reinhart-King C.A., Margulies S.S., Dembo M., Boettiger D.; et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 8(3). – P. 241-254.
 136. Pawłowski R., Rajakylä E.K., Vartiainen M.K., Treisman R. An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A // *Embo j.* – 2010. – Vol. 29(20). – P. 3448-3458.
 137. Chang L., Azzolin L., Di Biagio D., Zanconato F., Battilana G., Lucon Xiccato R., Aragona M., Giulitti S., Panciera T., Gandin A.; et al. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ // *Nature.* – 2018. – Vol. 563(7730). – P. 265-269.
 138. Kirby T.J., Lammerding J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor // *Nat Cell Biol.* – 2018. – Vol. 20(4). – P. 373-381.
 139. Elosegui-Artola A., Andreu I., Beedle A.E.M., Lezamiz A., Uroz M., Kosmalska A.J., Oria R., Kechagia J.Z., Rico-Lastres P., Le Roux A.L.; et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores // *Cell.* – 2017. – Vol. 171(6). – P. 1397-1410.e1314.
 140. Tajik A., Zhang Y., Wei F., Sun J., Jia Q., Zhou W., Singh R., Khanna N., Belmont A.S., Wang N. Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin // *Nat Mater.* – 2016. – Vol. 15(12). – P. 1287-1296.
 141. Swift J., Ivanovska I.L., Buxboim A., Harada T., Dingal P.C., Pinter J., Pajeroski J.D., Spinler K.R., Shin J.W., Tewari M.; et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation // *Science.* – 2013. – Vol. 341(6149). – P. 1240104.
 142. Ihalainen T.O., Aires L., Herzog F.A., Schwartlander R., Moeller J., Vogel V. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension // *Nat Mater.* – 2015. – Vol. 14(12). – P. 1252-1261.

143. Guilluy C., Osborne L.D., Van Landeghem L., Sharek L., Superfine R., Garcia-Mata R., Burridge K. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus // *Nat Cell Biol.* – 2014. – Vol. 16(4). – P. 376-381.
144. Elosegui-Artola A., Bazellières E., Allen M.D., Andreu I., Oria R., Sunyer R., Gomm J.J., Marshall J.F., Jones J.L., Trepas X.; et al. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types // *Nature Materials.* – 2014. – Vol. 13(6). – P. 631-637.
145. Wu Z., Plotnikov S.V., Moalim A.Y., Waterman C.M., Liu J. Two Distinct Actin Networks Mediate Traction Oscillations to Confer Focal Adhesion Mechanosensing // *Biophys J.* – 2017. – Vol. 112(4). – P. 780-794.
146. Wolfenson H., Meacci G., Liu S., Stachowiak M.R., Iskratsch T., Ghassemi S., Roca-Cusachs P., O'Shaughnessy B., Hone J., Sheetz M.P. Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices // *Nat Cell Biol.* – 2016. – Vol. 18(1). – P. 33-42.
147. Meacci G., Wolfenson H., Liu S., Stachowiak M.R., Iskratsch T., Mathur A., Ghassemi S., Gauthier N., Tabdanov E., Lohner J.; et al. α -Actinin links extracellular matrix rigidity-sensing contractile units with periodic cell-edge retractions // *Mol Biol Cell.* – 2016. – Vol. 27(22). – P. 3471-3479.
148. Chaudhuri O., Gu L., Darnell M., Klumpers D., Bencherif S.A., Weaver J.C., Huebsch N., Mooney D.J. Substrate stress relaxation regulates cell spreading // *Nature Communications.* – 2015. – Vol. 6(1). – P. 6365.
149. Wisdom K.M., Adebawale K., Chang J., Lee J.Y., Nam S., Desai R., Rossen N.S., Rafat M., West R.B., Hodgson L.; et al. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9(1). – P. 4144.
150. Alves F., Vogel W., Mossie K., Millauer B., Höfler H., Ullrich A. Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer // *Oncogene.* – 1995. – Vol. 10(3). – P. 609-618.
151. Vogel W., Gish G.D., Alves F., Pawson T. The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen // *Molecular Cell.* – 1997. – Vol. 1(1). – P. 13-23.
152. Valiathan R.R., Marco M., Leitinger B., Kleer C.G., Fridman R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – Vol. 31(1-2). – P. 295-321.
153. Carafoli F., Mayer M.C., Shiraishi K., Pecheva M.A., Chan L.Y., Nan R., Leitinger B., Hohenester E. Structure of the discoidin domain receptor 1

- extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling // *Structure*. – 2012. – Vol. 20(4). – P. 688-697.
154. Leitinger B., Kwan A.P. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen // *Matrix Biol*. – 2006. – Vol. 25(6). – P. 355-364.
 155. Leitinger B. Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2 // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278(19). – P. 16761-16769.
 156. Bhadriraju K., Chung K.H., Spurlin T.A., Haynes R.J., Elliott J.T., Plant A.L. The relative roles of collagen adhesive receptor DDR2 activation and matrix stiffness on the downregulation of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30(35). – P. 6687-6694.
 157. Agarwal G., Mihai C., Iscru D.F. Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1 // *J Mol Biol*. – 2007. – Vol. 367(2). – P. 443-455.
 158. Ferri N., Carragher N.O., Raines E.W. Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: potential implications in atherosclerosis and lymphangiomyomatosis // *Am J Pathol*. – 2004. – Vol. 164(5). – P. 1575-1585.
 159. Wall S.J., Werner E., Werb Z., DeClerck Y.A. Discoidin Domain Receptor 2 Mediates Tumor Cell Cycle Arrest Induced by Fibrillar Collagen * // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280(48). – P. 40187-40194.
 160. Dengjel J., Akimov V., Olsen J.V., Bunkenborg J., Mann M., Blagoev B., Andersen J.S. Quantitative proteomic assessment of very early cellular signaling events // *Nat Biotechnol*. – 2007. – Vol. 25(5). – P. 566-568.
 161. Avraham R., Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2011. – Vol. 12(2). – P. 104-117.
 162. Wang C.Z., Su H.W., Hsu Y.C., Shen M.R., Tang M.J. A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration // *Mol Biol Cell*. – 2006. – Vol. 17(6). – P. 2839-2852.
 163. Wang C.Z., Yeh Y.C., Tang M.J. DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2009. – Vol. 297(2). – P. C419-429.
 164. Amit I., Citri A., Shay T., Lu Y., Katz M., Zhang F., Tarcic G., Siwak D., Lahad J., Jacob-Hirsch J.; et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling // *Nat Genet*. – 2007. – Vol. 39(4). – P. 503-512.
 165. Gordus A., Krall J.A., Beyer E.M., Kaushansky A., Wolf-Yadlin A., Sevecka M.,

- Chang B.H., Rush J., MacBeath G. Linear combinations of docking affinities explain quantitative differences in RTK signaling // *Mol Syst Biol.* – 2009. – Vol. 5 – P. 235.
166. Lemeer S., Bluwstein A., Wu Z., Leberfinger J., Müller K., Kramer K., Kuster B. Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1 // *J Proteomics.* – 2012. – Vol. 75(12). – P. 3465-3477.
167. Curat C.A., Vogel W.F. Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells // *J Am Soc Nephrol.* – 2002. – Vol. 13(11). – P. 2648-2656.
168. Fu H.L., Valiathan R.R., Arkwright R., Sohail A., Mihai C., Kumarasiri M., Mahasen K.V., Mobashery S., Huang P., Agarwal G.; et al. Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288(11). – P. 7430-7437.
169. Flynn L.A., Blissett A.R., Calomeni E.P., Agarwal G. Inhibition of collagen fibrillogenesis by cells expressing soluble extracellular domains of DDR1 and DDR2 // *J Mol Biol.* – 2010. – Vol. 395(3). – P. 533-543.
170. Koo D.H., McFadden C., Huang Y., Abdulhussein R., Friese-Hamim M., Vogel W.F. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1 // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580(1). – P. 15-22.
171. Yang G., Li Q., Ren S., Lu X., Fang L., Zhou W., Zhang F., Xu F., Zhang Z., Zeng R.; et al. Proteomic, functional and motif-based analysis of C-terminal Src kinase-interacting proteins // *Proteomics.* – 2009. – Vol. 9(21). – P. 4944-4961.
172. Suh H.N., Han H.J. Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through $\alpha 2\beta 1$ integrin- and DDR1-dependent Bmi-1 // *J Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 226(12). – P. 3422-3432.
173. Lu K.K., Trcka D., Bendeck M.P. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src // *Cardiovasc Pathol.* – 2011. – Vol. 20(2). – P. 71-76.
174. Ongusaha P.P., Kim J.I., Fang L., Wong T.W., Yancopoulos G.D., Aaronson S.A., Lee S.W. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop // *Embo j.* – 2003. – Vol. 22(6). – P. 1289-1301.
175. Sweeney S.M., Orgel J.P., Fertala A., McAuliffe J.D., Turner K.R., Di Lullo G.A., Chen S., Antipova O., Perumal S., Ala-Kokko L.; et al. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283(30). – P. 21187-21197.
176. Jönsson M., Andersson T. Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation

- and modifies adhesion and migration of mammary cells // *J Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114(Pt 11). – P. 2043-2053.
177. Roarty K., Serra R. Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth // *Development.* – 2007. – Vol. 134(21). – P. 3929-3939.
 178. Iwai L.K., Chang F., Huang P.H. Phosphoproteomic analysis identifies insulin enhancement of discoidin domain receptor 2 phosphorylation // *Cell Adh Migr.* – 2013. – Vol. 7(2). – P. 161-164.
 179. Mariadoss A.V.A., Wang C.-Z. Exploring the Cellular and Molecular Mechanism of Discoidin Domain Receptors (DDR1 and DDR2) in Bone Formation, Regeneration, and Its Associated Disease Conditions // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24(19). – P. 14895.
 180. Staudinger L.A., Spano S.J., Lee W., Coelho N., Rajshankar D., Bendeck M.P., Moriarty T., McCulloch C.A. Interactions between the discoidin domain receptor 1 and β 1 integrin regulate attachment to collagen // *Biol Open.* – 2013. – Vol. 2(11). – P. 1148-1159.
 181. Licup A.J., Münster S., Sharma A., Sheinman M., Jawerth L.M., Fabry B., Weitz D.A., MacKintosh F.C. Stress controls the mechanics of collagen networks // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – Vol. 112(31). – P. 9573-9578.
 182. Coelho N.M., Arora P.D., van Putten S., Boo S., Petrovic P., Lin A.X., Hinz B., McCulloch C.A. Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 18(7). – P. 1774-1790.
 183. Roberts M.E., Magowan L., Hall I.P., Johnson S.R. Discoidin domain receptor 1 regulates bronchial epithelial repair and matrix metalloproteinase production // *Eur Respir J.* – 2011. – Vol. 37(6). – P. 1482-1493.
 184. Huang Y., Arora P., McCulloch C.A., Vogel W.F. The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA // *J Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122(Pt 10). – P. 1637-1646.
 185. Hidalgo-Carcedo C., Hooper S., Chaudhry S.I., Williamson P., Harrington K., Leitinger B., Sahai E. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6 // *Nat Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13(1). – P. 49-58.
 186. Leitinger B. Transmembrane collagen receptors // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2011. – Vol. 27 – P. 265-290.
 187. Siebel C., Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease // *Physiol Rev.* – 2017. – Vol. 97(4). – P. 1235-1294.
 188. Faló-Sanjuán J., Bray S. Notch-dependent and -independent transcription are

- modulated by tissue movements at gastrulation // *Elife*. – 2022. – Vol. 11 – P. e73656.
189. Faló-Sanjuán J., Bray S.J. Decoding the Notch signal // *Dev Growth Differ*. – 2020. – Vol. 62(1). – P. 4-14.
 190. Nandagopal N., Santat L.A., LeBon L., Sprinzak D., Bronner M.E., Elowitz M.B. Dynamic Ligand Discrimination in the Notch Signaling Pathway // *Cell*. – 2018. – Vol. 172(4). – P. 869-880.e819.
 191. Huenniger K., Krämer A., Soom M., Chang I., Köhler M., Depping R., Kehlenbach R.H., Kaether C. Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7 // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – Vol. 67(18). – P. 3187-3196.
 192. Stassen O., Ristori T., Sahlgren C.M. Notch in mechanotransduction - from molecular mechanosensitivity to tissue mechanostasis // *J Cell Sci*. – 2020. – Vol. 133(24). – P. jcs250738.
 193. Stephenson N.L., Avis J.M. Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109(41). – P. E2757-2765.
 194. Gordon W.R., Zimmerman B., He L., Miles L.J., Huang J., Tiyanont K., McArthur D.G., Aster J.C., Perrimon N., Loparo J.J.; et al. Mechanical Allosteric Activation of Notch: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch // *Dev Cell*. – 2015. – Vol. 33(6). – P. 729-736.
 195. Suarez Rodriguez F., Sanlidag S., Sahlgren C. Mechanical regulation of the Notch signaling pathway // *Curr Opin Cell Biol*. – 2023. – Vol. 85 – P. 102244.
 196. Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics // *Signal Transduct Target Ther*. – 2022. – Vol. 7(1). – P. 95.
 197. Kopan R., Ilagan M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism // *Cell*. – 2009. – Vol. 137(2). – P. 216-233.
 198. Moldovan G.E., Miele L., Fazleabas A.T. Notch signaling in reproduction // *Trends Endocrinol Metab*. – 2021. – Vol. 32(12). – P. 1044-1057.
 199. Sottoriva K., Pajcini K.V. Notch Signaling in the Bone Marrow Lymphopoietic Niche // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12 – P. 723055.
 200. Luo Z., Shang X., Zhang H., Wang G., Massey P.A., Barton S.R., Kevil C.G., Dong Y. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis // *Am J Pathol*. – 2019. – Vol. 189(8). – P. 1495-1500.
 201. Polacheck W.J., Kutys M.L., Yang J., Eyckmans J., Wu Y., Vasavada H., Hirschi K.K., Chen C.S. A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function // *Nature*. – 2017. – Vol. 552(7684). – P. 258-262.

202. Driessen R.C.H., Stassen O., Sjöqvist M., Suarez Rodriguez F., Grolleman J., Bouten C.V.C., Sahlgren C.M. Shear stress induces expression, intracellular reorganization and enhanced Notch activation potential of Jagged1 // *Integr Biol (Camb)*. – 2018. – Vol. 10(11). – P. 719-726.
203. van Engeland N.C.A., Suarez Rodriguez F., Rivero-Müller A., Ristori T., Duran C.L., Stassen O., Antfolk D., Driessen R.C.H., Ruohonen S., Ruohonen S.T.; et al. Vimentin regulates Notch signaling strength and arterial remodeling in response to hemodynamic stress // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 12415.
204. Souilhol C., Tardajos Ayllon B., Li X., Diagbouga M.R., Zhou Z., Canham L., Roddie H., Pirri D., Chambers E.V., Dunning M.J.; et al. JAG1-NOTCH4 mechanosensing drives atherosclerosis // *Sci Adv*. – 2022. – Vol. 8(35). – P. eabo7958.
205. Salvador J., Hernandez G.E., Ma F., Abrahamson C.W., Pellegrini M., Goldman R., Ridge K.M., Iruela-Arispe M.L. Transcriptional Evaluation of the Ductus Arteriosus at the Single-Cell Level Uncovers a Requirement for Vim (Vimentin) for Complete Closure // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2022. – Vol. 42(6). – P. 732-742.
206. Sweet D.T., Chen Z., Givens C.S., Owens A.P., Rojas M., Tzima E. Endothelial Shc regulates arteriogenesis through dual control of arterial specification and inflammation via the notch and nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B-cell pathways // *Circ Res*. – 2013. – Vol. 113(1). – P. 32-39.
207. Karthika C.L., Venugopal V., Sreelakshmi B.J., Krithika S., Thomas J.M., Abraham M., Kartha C.C., Rajavelu A., Sumi S. Oscillatory shear stress modulates Notch-mediated endothelial mesenchymal plasticity in cerebral arteriovenous malformations // *Cell Mol Biol Lett*. – 2023. – Vol. 28(1). – P. 22.
208. Luca V.C., Kim B.C., Ge C., Kakuda S., Wu D., Roein-Peikar M., Haltiwanger R.S., Zhu C., Ha T., Garcia K.C. Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligand sensitivity // *Science*. – 2017. – Vol. 355(6331). – P. 1320-1324.
209. Luca V.C., Jude K.M., Pierce N.W., Nachury M.V., Fischer S., Garcia K.C. Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4 // *Science*. – 2015. – Vol. 347(6224). – P. 847-853.
210. An C., Wang X., Song F., Hu J., Li L. Insights into intercellular receptor-ligand binding kinetics in cell communication // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2022. – Vol. 10 – P. 953353.
211. Chillakuri C.R., Sheppard D., Ilagan M.X., Holt L.R., Abbott F., Liang S., Kopan R., Handford P.A., Lea S.M. Structural analysis uncovers lipid-binding properties of Notch ligands // *Cell Rep*. – 2013. – Vol. 5(4). – P. 861-867.

212. Tarbell J.M., Ebong E.E. The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and -transducer // *Sci Signal.* – 2008. – Vol. 1(40). – P. pt8.
213. Zhao N., Liu H., Lilly B. Reciprocal regulation of syndecan-2 and Notch signaling in vascular smooth muscle cells // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287(20). – P. 16111-16120.
214. Varnum-Finney B., Wu L., Yu M., Brashem-Stein C., Staats S., Flowers D., Griffin J.D., Bernstein I.D. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling // *J Cell Sci.* – 2000. – Vol. 113 Pt 23 – P. 4313-4318.
215. Narui Y., Salaita K. Membrane tethered delta activates notch and reveals a role for spatio-mechanical regulation of the signaling pathway // *Biophys J.* – 2013. – Vol. 105(12). – P. 2655-2665.
216. Gonzalez-Perez D., Das S., Antfolk D., Ahsan H.S., Medina E., Dundes C.E., Jokhai R.T., Egan E.D., Blacklow S.C., Loh K.M.; et al. Affinity-matured DLL4 ligands as broad-spectrum modulators of Notch signaling // *Nat Chem Biol.* – 2023. – Vol. 19(1). – P. 9-17.
217. Chen N., Greenwald I. The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins // *Dev Cell.* – 2004. – Vol. 6(2). – P. 183-192.
218. Sloas D.C., Tran J.C., Marzilli A.M., Ngo J.T. Tension-tuned receptors for synthetic mechanotransduction and intercellular force detection // *Nat Biotechnol.* – 2023. – Vol. 41(9). – P. 1287-1295.
219. Seo D., Southard K.M., Kim J.-w., Lee H.J., Farlow J., Lee J.-u., Litt D.B., Haas T., Alivisatos A.P., Cheon J.; et al. A Mechanogenetic Toolkit for Interrogating Cell Signaling in Space and Time // *Cell.* – 2016. – Vol. 165(6). – P. 1507-1518.
220. Meloty-Kapella L., Shergill B., Kuon J., Botvinick E., Weinmaster G. Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin // *Dev Cell.* – 2012. – Vol. 22(6). – P. 1299-1312.
221. Chastagner P., Rubinstein E., Brou C. Ligand-activated Notch undergoes DTX4-mediated ubiquitylation and bilateral endocytosis before ADAM10 processing // *Sci Signal.* – 2017. – Vol. 10(483). – P. aag2989.
222. Antfolk D., Sjöqvist M., Cheng F., Isoniemi K., Duran C.L., Rivero-Muller A., Antila C., Niemi R., Landor S., Bouten C.V.C.; et al. Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 114(23). – P. E4574-e4581.
223. Gallenstein N., Tichy L., Weigand M.A., Schenz J. Notch Signaling in Acute Inflammation and Sepsis // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24(4). – P. 3458.

224. D'Assoro A.B., Leon-Ferre R., Braune E.B., Lendahl U. Roles of Notch Signaling in the Tumor Microenvironment // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23(11). – P. 6241.
225. Guo J., Li P., Liu X., Li Y. NOTCH signaling pathway and non-coding RNAs in cancer // *Pathol Res Pract.* – 2019. – Vol. 215(11). – P. 152620.
226. Caolo V., Debant M., Endesh N., Futers T.S., Lichtenstein L., Bartoli F., Parsonage G., Jones E.A., Beech D.J. Shear stress activates ADAM10 sheddase to regulate Notch1 via the Piezo1 force sensor in endothelial cells // *Elife.* – 2020. – Vol. 9 – P. e50684.
227. Miyagawa K., Shi M., Chen P.I., Hennigs J.K., Zhao Z., Wang M., Li C.G., Saito T., Taylor S., Sa S.; et al. Smooth Muscle Contact Drives Endothelial Regeneration by BMP2-Notch1-Mediated Metabolic and Epigenetic Changes // *Circ Res.* – 2019. – Vol. 124(2). – P. 211-224.
228. Mousavizadeh R., Hojabrpour P., Eltit F., McDonald P.C., Dedhar S., McCormack R.G., Duronio V., Jafarnejad S.M., Scott A. β 1 integrin, ILK and mTOR regulate collagen synthesis in mechanically loaded tendon cells // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10(1). – P. 12644.
229. Kwak M., Southard K.M., Kim W.R., Lin A., Kim N.H., Gopalappa R., Lee H.J., An M., Choi S.H., Jung Y.; et al. Adherens junctions organize size-selective proteolytic hotspots critical for Notch signalling // *Nat Cell Biol.* – 2022. – Vol. 24(12). – P. 1739-1753.
230. Nava M.M., Miroshnikova Y.A., Biggs L.C., Whitefield D.B., Metge F., Boucas J., Vihinen H., Jokitalo E., Li X., García Arcos J.M.; et al. Heterochromatin-Driven Nuclear Softening Protects the Genome against Mechanical Stress-Induced Damage // *Cell.* – 2020. – Vol. 181(4). – P. 800-817.e822.
231. Kindermann B., Valkova C., Krämer A., Perner B., Engelmann C., Behrendt L., Kritsch D., Jungnickel B., Kehlenbach R.H., Oswald F.; et al. The nuclear pore proteins Nup88/214 and T-cell acute lymphatic leukemia-associated NUP214 fusion proteins regulate Notch signaling // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294(31). – P. 11741-11750.
232. Klein E.A., Yin L., Kothapalli D., Castagnino P., Byfield F.J., Xu T., Levental I., Hawthorne E., Janmey P.A., Assoian R.K. Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening // *Curr Biol.* – 2009. – Vol. 19(18). – P. 1511-1518.
233. Nam S., Gupta V.K., Lee H.P., Lee J.Y., Wisdom K.M., Varma S., Flaum E.M., Davis C., West R.B., Chaudhuri O. Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive TRPV4-PI3K/Akt-p27(Kip1) signaling axis // *Sci Adv.* – 2019. – Vol. 5(8). – P. eaaw6171.

234. Davidson M.D., Song K.H., Lee M.H., Llewellyn J., Du Y., Baker B.M., Wells R.G., Burdick J.A. Engineered Fibrous Networks To Investigate the Influence of Fiber Mechanics on Myofibroblast Differentiation // *ACS Biomater Sci Eng.* – 2019. – Vol. 5(8). – P. 3899-3908.
235. Yamada K.M., Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2019. – Vol. 20(12). – P. 738-752.
236. Paul C.D., Mistriotis P., Konstantopoulos K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces // *Nat Rev Cancer.* – 2017. – Vol. 17(2). – P. 131-140.
237. Khetan S., Guvendiren M., Legant W.R., Cohen D.M., Chen C.S., Burdick J.A. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels // *Nature Materials.* – 2013. – Vol. 12(5). – P. 458-465.
238. Lee H.P., Stowers R., Chaudhuri O. Volume expansion and TRPV4 activation regulate stem cell fate in three-dimensional microenvironments // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10(1). – P. 529.
239. Yang B., Wei K., Loebel C., Zhang K., Feng Q., Li R., Wong S.H.D., Xu X., Lau C., Chen X.; et al. Enhanced mechanosensing of cells in synthetic 3D matrix with controlled biophysical dynamics // *Nature Communications.* – 2021. – Vol. 12(1). – P. 3514.
240. Raeber G.P., Lutolf M.P., Hubbell J.A. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration // *Biophys J.* – 2005. – Vol. 89(2). – P. 1374-1388.
241. Engler A., Bacakova L., Newman C., Hategan A., Griffin M., Discher D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses // *Biophys J.* – 2004. – Vol. 86(1 Pt 1). – P. 617-628.
242. Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death // *Science.* – 1997. – Vol. 276(5317). – P. 1425-1428.
243. Gjorevski N., Nikolaev M., Brown T.E., Mitrofanova O., Brandenberg N., DelRio F.W., Yavitt F.M., Liberali P., Anseth K.S., Lutolf M.P. Tissue geometry drives deterministic organoid patterning // *Science.* – 2022. – Vol. 375(6576). – P. eaaw9021.
244. Zhai M., Cui C., Ibrahim M., Han B., Li Q., Pacifici M., Lawrence J., Han L., Han L.-H. Regulating Mechanotransduction in Three Dimensions using Sub-Cellular Scale, Crosslinkable Fibers of Controlled Diameter, Stiffness, and Alignment // *Advanced Functional Materials.* – 2019. – Vol. 29 – P. 1808967.

245. Bodor D.L., Pönisch W., Endres R.G., Paluch E.K. Of Cell Shapes and Motion: The Physical Basis of Animal Cell Migration // *Dev Cell*. – 2020. – Vol. 52(5). – P. 550-562.
246. Isomursu A., Park K.Y., Hou J., Cheng B., Mathieu M., Shamsan G.A., Fuller B., Kasim J., Mahmoodi M.M., Lu T.J.; et al. Directed cell migration towards softer environments // *Nat Mater*. – 2022. – Vol. 21(9). – P. 1081-1090.
247. Yamashita H., Ichikawa T., Matsuyama D., Kimura Y., Ueda K., Craig S.W., Harada I., Kioka N. The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin α in sensing the stiffness of the extracellular matrix // *J Cell Sci*. – 2014. – Vol. 127(Pt 9). – P. 1875-1886.
248. Lo C.M., Wang H.B., Dembo M., Wang Y.L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate // *Biophys J*. – 2000. – Vol. 79(1). – P. 144-152.
249. Peyton S.R., Putnam A.J. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion // *J Cell Physiol*. – 2005. – Vol. 204(1). – P. 198-209.
250. Gardel M.L., Sabass B., Ji L., Danuser G., Schwarz U.S., Waterman C.M. Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed // *J Cell Biol*. – 2008. – Vol. 183(6). – P. 999-1005.
251. Sunyer R., Conte V., Escribano J., Elosegui-Artola A., Labernadie A., Valon L., Navajas D., García-Aznar J.M., Muñoz J.J., Roca-Cusachs P.; et al. Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission // *Science*. – 2016. – Vol. 353(6304). – P. 1157-1161.
252. Wolf K., Te Lindert M., Krause M., Alexander S., Te Riet J., Willis A.L., Hoffman R.M., Figdor C.G., Weiss S.J., Friedl P. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force // *J Cell Biol*. – 2013. – Vol. 201(7). – P. 1069-1084.
253. Harada T., Swift J., Irianto J., Shin J.W., Spinler K.R., Athirasala A., Diegmiller R., Dingal P.C., Ivanovska I.L., Discher D.E. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival // *J Cell Biol*. – 2014. – Vol. 204(5). – P. 669-682.
254. Fraley S.I., Wu P.H., He L., Feng Y., Krisnamurthy R., Longmore G.D., Wirtz D. Three-dimensional matrix fiber alignment modulates cell migration and MT1-MMP utility by spatially and temporally directing protrusions // *Sci Rep*. – 2015. – Vol. 5 – P. 14580.
255. Trappmann B., Baker B.M., Polacheck W.J., Choi C.K., Burdick J.A., Chen C.S. Matrix degradability controls multicellularity of 3D cell migration // *Nat Commun*. – 2017. – Vol. 8(1). – P. 371.

256. Lee H.-p., Alisafaei F., Adebawale K., Chang J., Shenoy V.B., Chaudhuri O. The nuclear piston activates mechanosensitive ion channels to generate cell migration paths in confining microenvironments // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7(2). – P. eabd4058.
257. Petrie R.J., Harlin H.M., Korsak L.I., Yamada K.M. Activating the nuclear piston mechanism of 3D migration in tumor cells // *J Cell Biol*. – 2017. – Vol. 216(1). – P. 93-100.
258. Polacheck W.J., German A.E., Mammoto A., Ingber D.E., Kamm R.D. Mechanotransduction of fluid stresses governs 3D cell migration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. – Vol. 111(7). – P. 2447-2452.
259. Vining K.H., Mooney D.J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2017. – Vol. 18(12). – P. 728-742.
260. Engler A.J., Griffin M.A., Sen S., Bönnemann C.G., Sweeney H.L., Discher D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments // *J Cell Biol*. – 2004. – Vol. 166(6). – P. 877-887.
261. Fu J., Wang Y.K., Yang M.T., Desai R.A., Yu X., Liu Z., Chen C.S. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates // *Nat Methods*. – 2010. – Vol. 7(9). – P. 733-736.
262. Wen J.H., Vincent L.G., Fuhrmann A., Choi Y.S., Hribar K.C., Taylor-Weiner H., Chen S., Engler A.J. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation // *Nature Materials*. – 2014. – Vol. 13(10). – P. 979-987.
263. Gilbert P.M., Havenstrite K.L., Magnusson K.E., Sacco A., Leonardi N.A., Kraft P., Nguyen N.K., Thrun S., Lutolf M.P., Blau H.M. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture // *Science*. – 2010. – Vol. 329(5995). – P. 1078-1081.
264. Stanton A.E., Tong X., Yang F. Extracellular matrix type modulates mechanotransduction of stem cells // *Acta Biomater*. – 2019. – Vol. 96 – P. 310-320.
265. Kilian K.A., Bugarija B., Lahn B.T., Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – Vol. 107(11). – P. 4872-4877.
266. Muncie J.M., Ayad N.M.E., Lakins J.N., Xue X., Fu J., Weaver V.M. Mechanical Tension Promotes Formation of Gastrulation-like Nodes and Patterns Mesoderm Specification in Human Embryonic Stem Cells // *Dev Cell*. – 2020. – Vol. 55(6). – P. 679-694.e611.

267. Huebsch N., Arany P.R., Mao A.S., Shvartsman D., Ali O.A., Bencherif S.A., Rivera-Feliciano J., Mooney D.J. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate // *Nat Mater.* – 2010. – Vol. 9(6). – P. 518-526.
268. Chaudhuri O., Gu L., Klumpers D., Darnell M., Bencherif S.A., Weaver J.C., Huebsch N., Lee H.P., Lippens E., Duda G.N.; et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity // *Nat Mater.* – 2016. – Vol. 15(3). – P. 326-334.
269. Arutyunyan I.V., Borovikov P.I., Dunaev A.G., Krotova L.I., Sviridov A.P., Trifanova E.M., Fatkhudinov T.H., Sukhikh G.T., Popov V.K. Poly-DL-lactide Degradation in Biological Media: Experiment and Model // *Inorganic Materials: Applied Research.* – 2021. – Vol. 12(2). – P. 377-385.
270. Das R.K., Gocheva V., Hammink R., Zouani O.F., Rowan A.E. Stress-stiffening-mediated stem-cell commitment switch in soft responsive hydrogels // *Nat Mater.* – 2016. – Vol. 15(3). – P. 318-325.
271. Shao Y., Sang J., Fu J. On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D bioengineering and mechanobiology // *Biomaterials.* – 2015. – Vol. 52 – P. 26-43.
272. Madl C.M., LeSavage B.L., Dewi R.E., Dinh C.B., Stowers R.S., Khariton M., Lampe K.J., Nguyen D., Chaudhuri O., Enejder A.; et al. Maintenance of neural progenitor cell stemness in 3D hydrogels requires matrix remodelling // *Nat Mater.* – 2017. – Vol. 16(12). – P. 1233-1242.
273. Kratochvil M.J., Seymour A.J., Li T.L., Paşca S.P., Kuo C.J., Heilshorn S.C. Engineered materials for organoid systems // *Nat Rev Mater.* – 2019. – Vol. 4(9). – P. 606-622.
274. Rezakhani S., Gjorevski N., Lutolf M.P. Extracellular matrix requirements for gastrointestinal organoid cultures // *Biomaterials.* – 2021. – Vol. 276 – P. 121020.
275. Enemchukwu N.O., Cruz-Acuña R., Bongiorno T., Johnson C.T., García J.R., Sulchek T., García A.J. Synthetic matrices reveal contributions of ECM biophysical and biochemical properties to epithelial morphogenesis // *J Cell Biol.* – 2016. – Vol. 212(1). – P. 113-124.
276. Gjorevski N., Sachs N., Manfrin A., Giger S., Bragina M.E., Ordóñez-Morán P., Clevers H., Lutolf M.P. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture // *Nature.* – 2016. – Vol. 539(7630). – P. 560-564.
277. Cruz-Acuña R., Quirós M., Farkas A.E., Dedhia P.H., Huang S., Siuda D., García-Hernández V., Miller A.J., Spence J.R., Nusrat A.; et al. Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair // *Nat Cell Biol.* – 2017. – Vol. 19(11). – P. 1326-1335.

278. Ranga A., Girgin M., Meinhardt A., Eberle D., Caiazzo M., Tanaka E.M., Lutolf M.P. Neural tube morphogenesis in synthetic 3D microenvironments // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – Vol. 113(44). – P. E6831-e6839.
279. Chrisnandy A., Blondel D., Rezakhani S., Broguiere N., Lutolf M.P. Synthetic dynamic hydrogels promote degradation-independent in vitro organogenesis // *Nat Mater.* – 2022. – Vol. 21(4). – P. 479-487.
280. Blatchley M., Hall F., Wang S., Pruitt H., Gerecht S. Hypoxia and matrix viscoelasticity sequentially regulate endothelial progenitor cluster-based vasculogenesis // *Science Advances.* – 2019. – Vol. 5 – P. eaau7518.
281. Sorrentino G., Rezakhani S., Yildiz E., Nuciforo S., Heim M.H., Lutolf M.P., Schoonjans K. Mechano-modulatory synthetic niches for liver organoid derivation // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11(1). – P. 3416.
282. Blache U., Stevens M.M., Gentleman E. Harnessing the secreted extracellular matrix to engineer tissues // *Nat Biomed Eng.* – 2020. – Vol. 4(4). – P. 357-363.
283. Lee H.P., Gu L., Mooney D.J., Levenston M.E., Chaudhuri O. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes // *Nat Mater.* – 2017. – Vol. 16(12). – P. 1243-1251.
284. Borelli A.N., Young M.W., Kirkpatrick B.E., Jaeschke M.W., Mellett S., Porter S., Blatchley M.R., Rao V.V., Sridhar B.V., Anseth K.S. Stress Relaxation and Composition of Hydrazone-Crosslinked Hybrid Biopolymer-Synthetic Hydrogels Determine Spreading and Secretory Properties of MSCs // *Adv Healthc Mater.* – 2022. – Vol. 11(14). – P. e2200393.
285. Sridhar B.V., Brock J.L., Silver J.S., Leight J.L., Randolph M.A., Anseth K.S. Development of a cellularly degradable PEG hydrogel to promote articular cartilage extracellular matrix deposition // *Adv Healthc Mater.* – 2015. – Vol. 4(5). – P. 702-713.
286. Smythies J. Intercellular Signaling in Cancer-the SMT and TOFT Hypotheses, Exosomes, Telocytes and Metastases: Is the Messenger in the Message? // *J Cancer.* – 2015. – Vol. 6(7). – P. 604-609.
287. Sonnenschein C., Soto A.M. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2016. – Vol. 122(1). – P. 70-76.
288. Lemaire J., Larrue R., Perrais M., Cauffiez C., Pottier N. [Fundamental aspects of oncogenesis] // *Bull Cancer.* – 2020. – Vol. 107(11). – P. 1148-1160.
289. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – Vol. 144(5). – P. 646-674.
290. Jiang Y., Zhang H., Wang J., Liu Y., Luo T., Hua H. Targeting extracellular matrix stiffness and mechanotransducers to improve cancer therapy // *J Hematol*

- Oncol. – 2022. – Vol. 15(1). – P. 34.
291. Wozniak M.A., Desai R., Solski P.A., Der C.J., Keely P.J. ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix // *J Cell Biol.* – 2003. – Vol. 163(3). – P. 583-595.
 292. Ondeck M.G., Kumar A., Placone J.K., Plunkett C.M., Matte B.F., Wong K.C., Fattet L., Yang J., Engler A.J. Dynamically stiffened matrix promotes malignant transformation of mammary epithelial cells via collective mechanical signaling // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – Vol. 116(9). – P. 3502-3507.
 293. Stowers R.S., Shcherbina A., Israeli J., Gruber J.J., Chang J., Nam S., Rabiee A., Teruel M.N., Snyder M.P., Kundaje A.; et al. Matrix stiffness induces a tumorigenic phenotype in mammary epithelium through changes in chromatin accessibility // *Nat Biomed Eng.* – 2019. – Vol. 3(12). – P. 1009-1019.
 294. Chaudhuri O., Koshy S.T., Branco da Cunha C., Shin J.W., Verbeke C.S., Allison K.H., Mooney D.J. Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium // *Nat Mater.* – 2014. – Vol. 13(10). – P. 970-978.
 295. Schrader J., Gordon-Walker T.T., Aucott R.L., van Deemter M., Quaas A., Walsh S., Benten D., Forbes S.J., Wells R.G., Iredale J.P. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 53(4). – P. 1192-1205.
 296. Nukuda A., Sasaki C., Ishihara S., Mizutani T., Nakamura K., Ayabe T., Kawabata K., Haga H. Stiff substrates increase YAP-signaling-mediated matrix metalloproteinase-7 expression // *Oncogenesis.* – 2015. – Vol. 4(9). – P. e165.
 297. Yuan Y., Zhong W., Ma G., Zhang B., Tian H. Yes-associated protein regulates the growth of human non-small cell lung cancer in response to matrix stiffness // *Mol Med Rep.* – 2015. – Vol. 11(6). – P. 4267-4272.
 298. Lee J., Condello S., Yakubov B., Emerson R., Caperell-Grant A., Hitomi K., Xie J., Matei D. Tissue Transglutaminase Mediated Tumor-Stroma Interaction Promotes Pancreatic Cancer Progression // *Clin Cancer Res.* – 2015. – Vol. 21(19). – P. 4482-4493.
 299. Ishihara S., Inman D.R., Li W.J., Ponik S.M., Keely P.J. Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77(22). – P. 6179-6189.
 300. Hupfer A., Brichkina A., Koeniger A., Keber C., Denkert C., Pfefferle P., Helmprobst F., Pagenstecher A., Visekruna A., Lauth M. Matrix stiffness drives

- stromal autophagy and promotes formation of a protumorigenic niche // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – Vol. 118(40). – P. e2105367118.
301. Watson A.W., Grant A.D., Parker S.S., Hill S., Whalen M.B., Chakrabarti J., Harman M.W., Roman M.R., Forte B.L., Gowan C.C.; et al. Breast tumor stiffness instructs bone metastasis via maintenance of mechanical conditioning // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 35(13). – P. 109293.
 302. Wang C., Sinha S., Jiang X., Murphy L., Fitch S., Wilson C., Grant G., Yang F. Matrix Stiffness Modulates Patient-Derived Glioblastoma Cell Fates in Three-Dimensional Hydrogels // *Tissue engineering. Part A.* – 2021. – Vol. 27(5-6). – P. 390-401.
 303. Peng Y., Chen Z., Chen Y., Li S., Jiang Y., Yang H., Wu C., You F., Zheng C., Zhu J.; et al. ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness // *Acta biomaterialia.* – 2019. – Vol. 88 – P. 86-101.
 304. Baker A.M., Bird D., Lang G., Cox T.R., Erler J.T. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32(14). – P. 1863-1868.
 305. Chen Y., Terajima M., Yang Y., Sun L., Ahn Y.H., Pankova D., Puperi D.S., Watanabe T., Kim M.P., Blackmon S.H.; et al. Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma // *J Clin Invest.* – 2015. – Vol. 125(3). – P. 1147-1162.
 306. Wei S.C., Fattet L., Tsai J.H., Guo Y., Pai V.H., Majeski H.E., Chen A.C., Sah R.L., Taylor S.S., Engler A.J.; et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway // *Nat Cell Biol.* – 2015. – Vol. 17(5). – P. 678-688.
 307. Fattet L., Jung H.Y., Matsumoto M.W., Aubol B.E., Kumar A., Adams J.A., Chen A.C., Sah R.L., Engler A.J., Pasquale E.B.; et al. Matrix Rigidity Controls Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Tumor Metastasis via a Mechanoresponsive EPHA2/LYN Complex // *Dev Cell.* – 2020. – Vol. 54(3). – P. 302-316.e307.
 308. Dong Y., Zheng Q., Wang Z., Lin X., You Y., Wu S., Wang Y., Hu C., Xie X., Chen J.; et al. Higher matrix stiffness as an independent initiator triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC metastasis // *J Hematol Oncol.* – 2019. – Vol. 12(1). – P. 112.
 309. Berger A.J., Renner C.M., Hale I., Yang X., Ponik S.M., Weisman P.S., Masters K.S., Kreeger P.K. Scaffold stiffness influences breast cancer cell invasion via EGFR-linked Mena upregulation and matrix remodeling // *Matrix Biol.* – 2020.

- Vol. 85-86 – P. 80-93.
310. Chang J., Pang E.M., Adebowale K., Wisdom K.M., Chaudhuri O. Increased Stiffness Inhibits Invadopodia Formation and Cell Migration in 3D // *Biophys J.* – 2020. – Vol. 119(4). – P. 726-736.
 311. Torrino S., Grasset E.M., Audebert S., Belhadj I., Lacoux C., Haynes M., Pisano S., Abélanet S., Brau F., Chan S.Y.; et al. Mechano-induced cell metabolism promotes microtubule glutamylation to force metastasis // *Cell Metab.* – 2021. – Vol. 33(7). – P. 1342-1357.e1310.
 312. Reid S.E., Kay E.J., Neilson L.J., Henze A.T., Serneels J., McGhee E.J., Dhayade S., Nixon C., Mackey J.B., Santi A.; et al. Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium // *Embo j.* – 2017. – Vol. 36(16). – P. 2373-2389.
 313. Bertero T., Oldham W.M., Grasset E.M., Bourget I., Boulter E., Pisano S., Hofman P., Bellvert F., Meneguzzi G., Bulavin D.V.; et al. Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy // *Cell Metab.* – 2019. – Vol. 29(1). – P. 124-140.e110.
 314. Reuten R., Zendeheroud S., Nicolau M., Fleischhauer L., Laitala A., Kiderlen S., Nikodemus D., Wullkopf L., Nielsen S.R., McNeilly S.; et al. Basement membrane stiffness determines metastases formation // *Nat Mater.* – 2021. – Vol. 20(6). – P. 892-903.
 315. Hoshiba T. Cultured cell-derived decellularized matrices: a review towards the next decade // *J Mater Chem B.* – 2017. – Vol. 5(23). – P. 4322-4331.
 316. Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B.; et al. Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: a paradigm shift in regenerative medicine // *Adv Mater.* – 2014. – Vol. 26(19). – P. 3024-3034.
 317. Soucy P.A., Werbin J., Heinz W., Hoh J.H., Romer L.H. Microelastic properties of lung cell-derived extracellular matrix // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7(1). – P. 96-105.
 318. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. Decellularization of tissues and organs // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27(19). – P. 3675-3683.
 319. Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance // *Methods.* – 2015. – Vol. 84 – P. 25-34.
 320. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32(12). – P. 3233-3243.

321. Kozłowski M.T., Crook C.J., Ku H.T. Towards organoid culture without Matrigel // *Commun Biol.* – 2021. – Vol. 4(1). – P. 1387.
322. Hussey G.S., Dziki J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine // *Nature Reviews Materials.* – 2018. – Vol. 3(7). – P. 159-173.
323. Yu Y., Alkhwajji A., Ding Y., Mei J. Decellularized scaffolds in regenerative medicine // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7(36). – P. 58671-58683.
324. Allman A.J., McPherson T.B., Badylak S.F., Merrill L.C., Kallakury B., Sheehan C., Raeder R.H., Metzger D.W. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 71(11). – P. 1631-1640.
325. Guyette J.P., Gilpin S.E., Charest J.M., Tapias L.F., Ren X., Ott H.C. Perfusion decellularization of whole organs // *Nat Protoc.* – 2014. – Vol. 9(6). – P. 1451-1468.
326. Moffat D., Ye K., Jin S. Decellularization for the retention of tissue niches // *J Tissue Eng.* – 2022. – Vol. 13 – P. 20417314221101151.
327. Somuncu Ö S. Decellularization Concept in Regenerative Medicine // *Advances in experimental medicine and biology.* – 2020. – Vol. 1212 – P. 71-85.
328. Neishabouri A., Soltani Khaboushan A., Daghigh F., Kajbafzadeh A.M., Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10 – P. 805299.
329. Buckenmeyer M.J., Meder T.J., Prest T.A., Brown B.N. Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system // *Methods.* – 2020. – Vol. 171 – P. 41-61.
330. Svensson K.J., Christianson H.C., Kucharzewska P., Fagerström V., Lundstedt L., Borgquist S., Jirström K., Belting M. Chondroitin sulfate expression predicts poor outcome in breast cancer // *Int J Oncol.* – 2011. – Vol. 39(6). – P. 1421-1428.
331. Jahkola T., Toivonen T., Virtanen I., von Smitten K., Nordling S., von Boguslawski K., Haglund C., Nevanlinna H., Blomqvist C. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence // *Br J Cancer.* – 1998. – Vol. 78(11). – P. 1507-1513.
332. Hoshiba T. Decellularized Extracellular Matrix for Cancer Research // *Materials (Basel).* – 2019. – Vol. 12(8). – P. 1311.
333. Naba A., Clauser K.R., Hoersch S., Liu H., Carr S.A., Hynes R.O. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of

- normal and tumor extracellular matrices // *Mol Cell Proteomics*. – 2012. – Vol. 11(4). – P. M111.014647.
334. Cox T.R. The matrix in cancer // *Nat Rev Cancer*. – 2021. – Vol. 21(4). – P. 217-238.
335. Mishra D.K., Thrall M.J., Baird B.N., Ott H.C., Blackmon S.H., Kurie J.M., Kim M.P. Human lung cancer cells grown on acellular rat lung matrix create perfusable tumor nodules // *Ann Thorac Surg*. – 2012. – Vol. 93(4). – P. 1075-1081.
336. Chen H., Wei Z., Sun J., Bhattacharya A., Savage D., Serda R.E., Mackeyev Y., Bu P., Wang L., Chen S.; et al. A recellularized human colon model identifies cancer driver genes // *Nature biotechnology*. – 2016. – Vol. 34 – P. 845–851.
337. Dunne L.W., Huang Z., Meng W., Fan X., Zhang N., Zhang Q., An Z. Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35(18). – P. 4940-4949.
338. Piccoli M., D'Angelo E., Crotti S., Sensi F., Urbani L., Maghin E., Burns A., De Coppi P., Fassan M., Rugge M.; et al. Decellularized colorectal cancer matrix as bioactive microenvironment for in vitro 3D cancer research // *J Cell Physiol*. – 2018. – Vol. 233(8). – P. 5937-5948.
339. Koh I., Cha J., Park J., Choi J., Kang S.G., Kim P. The mode and dynamics of glioblastoma cell invasion into a decellularized tissue-derived extracellular matrix-based three-dimensional tumor model // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8(1). – P. 4608.
340. D'Angelo E., Natarajan D., Sensi F., Fassan M., Mammano E., Pilati P., Pavan P., Bresolin S., Preziosi M., Miquel R.; et al. Patient-Derived Scaffolds of Colorectal Cancer Metastases as an Organotypic 3D Model of the Liver Metastatic Microenvironment // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12 – P. 364.
341. Liao J., Xu B., Zhang R., Fan Y., Xie H., Li X. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives // *J Mater Chem B*. – 2020. – Vol. 8(44). – P. 10023-10049.
342. Gentilin E., D'Angelo E., Agostini M., Astolfi L. Decellularized normal and cancer tissues as tools for cancer research // *Cancer Gene Ther*. – 2022. – Vol. 29(7). – P. 879-888.
343. Xiong G., Flynn T.J., Chen J., Trinkle C., Xu R. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing a decellularized lung matrix // *Integr Biol (Camb)*. – 2015. – Vol. 7(12). – P. 1518-1525.
344. Hoshiba T., Tanaka M. Breast cancer cell behaviors on staged tumorigenesis-

- mimicking matrices derived from tumor cells at various malignant stages // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – Vol. 439(2). – P. 291-296.
345. Saraswathibhatla A., Indana D., Chaudhuri O. Cell-extracellular matrix mechanotransduction in 3D // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2023. – Vol. 24(7). – P. 495-516.
346. Bahcecioglu G., Basara G., Ellis B.W., Ren X., Zorlutuna P. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 106 – P. 1-21.
347. 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. – Vol. 9(12). – P. 446.
348. Efremov Y.M., Shpichka A.I., Kotova S.L., Timashev P.S. Viscoelastic mapping of cells based on fast force volume and PeakForce Tapping // *Soft matter.* – 2019. – Vol. 15(27). – P. 5455-5463.
349. Bikmulina P., Kosheleva N., Efremov Y., Antoshin A., Heydari Z., Kapustina V., Royuk V., Mikhaylov V., Fomin V., Vosough M.; et al. 3D or not 3D: a guide to assess cell viability in 3D cell systems // *Soft matter.* – 2022. – Vol. 18(11). – P. 2222-2233.
350. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method // *Nature Protocols.* – 2008. – Vol. 3(6). – P. 1101-1108.
351. Klopotowska D., Matuszyk J. Downregulation of MALAT1 in triple-negative breast cancer cells // *Biochem Biophys Rep.* – 2024. – Vol. 37 – P. 101592.
352. Liu Y., Zhang H., Liu Y., Zhang S., Su P., Wang L., Li Y., Liang Y., Wang X., Zhao W.; et al. Hypoxia-induced GPCPD1 depalmitoylation triggers mitophagy via regulating PRKN-mediated ubiquitination of VDAC1 // *Autophagy.* – 2023. – Vol. 19(9). – P. 2443-2463.
353. Tang D., Chen M., Huang X., Zhang G., Zeng L., Zhang G., Wu S., Wang Y. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing // *PLoS One.* – 2023. – Vol. 18(11). – P. e0294236.
354. Fernández-Pérez J., Ahearne M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9(1). – P. 14933.
355. Friedrich E.E., Lanier S.T., Niknam-Bienia S., Arenas G.A., Rajendran D., Wertheim J.A., Galiano R.D. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2018. – Vol. 12(3). – P. e1704-e1715.

356. Vavken P., Joshi S., Murray M.M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering // *J Orthop Res.* – 2009. – Vol. 27(12). – P. 1612-1618.
357. Edgar L., Pu T., Porter B., Aziz J.M., La Pointe C., Asthana A., Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation // *The British journal of surgery.* – 2020. – Vol. 107(7). – P. 793-800.
358. Boughton O.R., Ma S., Zhao S., Arnold M., Lewis A., Hansen U., Cobb J.P., Giuliani F., Abel R.L. Measuring bone stiffness using spherical indentation // *PloS one.* – 2018. – Vol. 13(7). – P. e0200475.
359. Levental I., Levental K.R., Klein E.A., Assoian R., Miller R.T., Wells R.G., Janmey P.A. A simple indentation device for measuring micrometer-scale tissue stiffness // *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal.* – 2010. – Vol. 22(19). – P. 194120.
360. Sim S., Chevrier A., Garon M., Quenneville E., Lavigne P., Yaroshinsky A., Hoemann C.D., Buschmann M.D. Electromechanical probe and automated indentation maps are sensitive techniques in assessing early degenerated human articular cartilage // *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* – 2017. – Vol. 35(4). – P. 858-867.
361. Rahman S., Griffin M., Naik A., Szarko M., Butler P.E.M. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8(1). – P. 3097.
362. Guimarães C.F., Gasperini L., Marques A.P., Reis R.L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering // *Nature Reviews Materials.* – 2020. – Vol. 5(5). – P. 351-370.
363. Luque T., Melo E., Garreta E., Cortiella J., Nichols J., Farré R., Navajas D. Local micromechanical properties of decellularized lung scaffolds measured with atomic force microscopy // *Acta biomaterialia.* – 2013. – Vol. 9(6). – P. 6852-6859.
364. Song Y.H., Maynes M.A., Hlavac N., Visosevic D., Daramola K.O., Porvasnik S.L., Schmidt C.E. Development of novel apoptosis-assisted lung tissue decellularization methods // *Biomaterials science.* – 2021. – Vol. 9(9). – P. 3485-3498.
365. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status // *Advances in experimental medicine and biology.* – 2019. – Vol. 1152 – P. 51-64.
366. Amaro A., Angelini G., Mirisola V., Esposito A.I., Reverberi D., Matis S., Maffei M., Giaretti W., Viale M., Gangemi R.; et al. A highly invasive subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells shows accelerated growth, differential

- chemoresistance, features of apocrine tumors and reduced tumorigenicity in vivo // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7(42). – P. 68803-68820.
367. Le C.C., Bennisroune A., Collin G., Hachet C., Lehrter V., Rioult D., Dedieu S., Morjani H., Appert-Collin A. LRP-1 Promotes Colon Cancer Cell Proliferation in 3D Collagen Matrices by Mediating DDR1 Endocytosis // *Front Cell Dev Biol*. – 2020. – Vol. 8 – P. 412.
368. Gadiya M., Chakraborty G. Signaling by discoidin domain receptor 1 in cancer metastasis // *Cell Adh Migr*. – 2018. – Vol. 12(4). – P. 315-323.
369. Kenny P.A., Lee G.Y., Myers C.A., Neve R.M., Semeiks J.R., Spellman P.T., Lorenz K., Lee E.H., Barcellos-Hoff M.H., Petersen O.W.; et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression // *Mol Oncol*. – 2007. – Vol. 1(1). – P. 84-96.
370. Marconi G.D., Porcheri C., Trubiani O., Mitsiadis T.A. Three-Dimensional Culture Systems for Dissecting Notch Signalling in Health and Disease // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22(22). – P. 12473.
371. Augustin S., Berard M., Kellaf S., Peyri N., Fauvel-Lafève F., Legrand C., He L., Crépin M. Matrix metalloproteinases are involved in both type I (apoptosis) and type II (autophagy) cell death induced by sodium phenylacetate in MDA-MB-231 breast tumour cells // *Anticancer Res*. – 2009. – Vol. 29(4). – P. 1335-1343.
372. Mehner C., Hockla A., Miller E., Ran S., Radisky D.C., Radisky E.S. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5(9). – P. 2736–2749.
373. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2019. – Vol. 20(2). – P. 69-84.
374. Haslehurst A.M., Koti M., Dharsee M., Nuin P., Evans K., Geraci J., Childs T., Chen J., Li J., Weberpals J.; et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12 – P. 91.
375. Lambertini E., Franceschetti T., Torreggiani E., Penolazzi L., Pastore A., Pelucchi S., Gambari R., Piva R. SLUG: a new target of lymphoid enhancer factor-1 in human osteoblasts // *BMC Mol Biol*. – 2010. – Vol. 11 – P. 13.
376. Tamagnone L., Zacchigna S., Rehman M. Taming the Notch Transcriptional Regulator for Cancer Therapy // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23(2). – P. 431.

377. Van Tam J.K., Uto K., Ebara M., Pagliari S., Forte G., Aoyagi T. Mesenchymal stem cell adhesion but not plasticity is affected by high substrate stiffness // *Sci Technol Adv Mater.* – 2012. – Vol. 13(6). – P. 064205.
378. Liang Y., Zhang H., Song X., Yang Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets // *Semin Cancer Biol.* – 2020. – Vol. 60 – P. 14-27.
379. Safaee H., Bakooshli M.A., Davoudi S., Cheng R.Y., Martowirogo A.J., Li E.W., Simmons C.A., Gilbert P.M. Tethered Jagged-1 Synergizes with Culture Substrate Stiffness to Modulate Notch-Induced Myogenic Progenitor Differentiation // *Cell Mol Bioeng.* – 2017. – Vol. 10(5). – P. 501-513.
380. Velez D.O., Ranamukhaarachchi S.K., Kumar A., Modi R.N., Lim E.W., Engler A.J., Metallo C.M., Fraley S.I. 3D collagen architecture regulates cell adhesion through degradability, thereby controlling metabolic and oxidative stress // *Integr Biol (Camb).* – 2019. – Vol. 11(5). – P. 221-234.
381. Coelho N.M., Wang A., McCulloch C.A. Discoidin domain receptor 1 interactions with myosin motors contribute to collagen remodeling and tissue fibrosis // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2019. – Vol. 1866(11). – P. 118510.
382. Zhang K., Grither W.R., Van Hove S., Biswas H., Ponik S.M., Eliceiri K.W., Keely P.J., Longmore G.D. Mechanical signals regulate and activate SNAIL1 protein to control the fibrogenic response of cancer-associated fibroblasts // *J Cell Sci.* – 2016. – Vol. 129(10). – P. 1989-2002.
383. Stanisavljevic J., Loubat-Casanovas J., Herrera M., Luque T., Peña R., Lluch A., Albanell J., Bonilla F., Rovira A., Peña C.; et al. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75(2). – P. 284-295.
384. Zhou Q., Wang Y., Peng B., Liang L., Li J. The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma // *BMC Cancer.* – 2013. – Vol. 13(1). – P. 244.
385. Schuhwerk H., Brabletz T. Mutual regulation of TGF β -induced oncogenic EMT, cell cycle progression and the DDR // *Semin Cancer Biol.* – 2023. – Vol. 97 – P. 86-103.
386. Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism // *Dev Cell.* – 2010. – Vol. 18(6). – P. 884-901.
387. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment // *Cancer Cell.* – 2012. – Vol. 21(3). – P. 309-322.

388. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S.; et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction // *Nature*. – 2011. – Vol. 474(7350). – P. 179-183.
389. Shen Y., Wang X., Lu J., Salfenmoser M., Wirsik N.M., Schleussner N., Imle A., Freire Valls A., Radhakrishnan P., Liang J.; et al. Reduction of Liver Metastasis Stiffness Improves Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 37(6). – P. 800-817.e807.
390. Wei J., Yao J., Yang C., Mao Y., Zhu D., Xie Y., Liu P., Yan M., Ren L., Lin Y.; et al. Heterogeneous matrix stiffness regulates the cancer stem-like cell phenotype in hepatocellular carcinoma // *Journal of Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 20(1). – P. 555.
391. Jorba I., Beltrán G., Falcones B., Suki B., Farré R., García-Aznar J.M., Navajas D. Nonlinear elasticity of the lung extracellular microenvironment is regulated by macroscale tissue strain // *Acta biomaterialia*. – 2019. – Vol. 92 – P. 265-276.
392. Jorba I., Uriarte J.J., Campillo N., Farré R., Navajas D. Probing Micromechanical Properties of the Extracellular Matrix of Soft Tissues by Atomic Force Microscopy // *Journal of cellular physiology*. – 2017. – Vol. 232(1). – P. 19-26.
393. Xu D., Harvey T., Begiristain E., Domínguez C., Sánchez-Abella L., Browne M., Cook R.B. Measuring the elastic modulus of soft biomaterials using nanoindentation // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2022. – Vol. 133 – P. 105329.
394. Mattei G., Di Patria V., Tirella A., Alaimo A., Elia G., Corti A., Paolicchi A., Ahluwalia A. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10(2). – P. 875-882.
395. Evans D., Moran E., Baptista P., Soker S., Sparks J. Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue // *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. – 2012. – Vol. 12 – P. 569–580.
396. Xiang J., Liu P., Zheng X., Dong D., Fan S., Dong J., Zhang X., Liu X., Wang B., Lv Y. The effect of riboflavin/UVA cross-linking on anti-degeneration and promoting angiogenic capability of decellularized liver matrix // *Journal of biomedical materials research. Part A*. – 2017. – Vol. 105(10). – P. 2662-2669.
397. Grant R., Hallett J., Forbes S., Hay D., Callanan A. Blended electrospinning with human liver extracellular matrix for engineering new hepatic microenvironments // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 6293.
398. Shirani A., Ganji F., Golmohammadi M., Hashemi S.M., Mozafari M., Amoabediny G., Karkuki Osguei N., Samadikuchaksaraei A. Cross-linked acellular lung for application in tissue engineering: Effects on biocompatibility,

- mechanical properties and immunological responses // *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications.* – 2021. – Vol. 122 – P. 111938.
399. Wang Z., Wang Z., Yu Q., Xi H., Weng J., Du X., Chen D., Ma J., Mei J., Chen C. Comparative study of two perfusion routes with different flow in decellularization to harvest an optimal pulmonary scaffold for recellularization // *Journal of biomedical materials research. Part A.* – 2016. – Vol. 104(10). – P. 2567-2575.
400. Poornejad N., Frost T.S., Scott D.R., Elton B.B., Reynolds P.R., Roeder B.L., Cook A.D. Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but not Decellularized Porcine Renal Tissue // *Organogenesis.* – 2015. – Vol. 11(1). – P. 30-45.
401. Taylor D.A., Kren S.M., Rhett K., Robertson M.J., Morrissey J., Rodriguez O.E., Virk H., Chacon-Alberty L., Curty da Costa E., Mesquita F.C.P.; et al. Characterization of perfusion decellularized whole animal body, isolated organs, and multi-organ systems for tissue engineering applications // *Physiological reports.* – 2021. – Vol. 9(12). – P. e14817.
402. Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Kravtsova E.A., Tsydenova I.A., Litviakov N.V. Organ-Specificity of Breast Cancer Metastasis // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24(21). – P. 15625.
403. Magalhaes I., Yogev O., Mattsson J., Schurich A. The Metabolic Profile of Tumor and Virally Infected Cells Shapes Their Microenvironment Counteracting T Cell Immunity // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10 – P. 2309.
404. Elia I., Haigis M.C. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism // *Nat Metab.* – 2021. – Vol. 3(1). – P. 21-32.
405. Kubeček O., Laco J., Špaček J., Petera J., Kopecký J., Kubečková A., Filip S. The pathogenesis, diagnosis, and management of metastatic tumors to the ovary: a comprehensive review // *Clin Exp Metastasis.* – 2017. – Vol. 34(5). – P. 295-307.
406. Bogliolo S., Morotti M., Valenzano Menada M., Fulcheri E., Musizzano Y., Casabona F. Breast cancer with synchronous massive metastasis in the uterine cervix: a case report and review of the literature // *Arch Gynecol Obstet.* – 2010. – Vol. 281(4). – P. 769-773.
407. Karaosmanoglu A.D., Onur M.R., Salman M.C., Usubutun A., Karcaaltincaba M., Ozmen M.N., Akata D. Imaging in secondary tumors of the ovary // *Abdom Radiol (NY).* – 2019. – Vol. 44(4). – P. 1493-1505.
408. Atat O.E., Farzaneh Z., Pourhamzeh M., Taki F., Abi-Habib R., Vosough M., El-

- Sibai M. 3D modeling in cancer studies // *Hum Cell.* – 2022. – Vol. 35(1). – P. 23-36.
409. Sheykhzadeh S., Luo M., Peng B., White J., Abdalla Y., Tang T., Mäkilä E., Voelcker N.H., Tong W.Y. Transferrin-targeted porous silicon nanoparticles reduce glioblastoma cell migration across tight extracellular space // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10(1). – P. 2320.
410. Wolf K., Alexander S., Schacht V., Coussens L., Andrian U., van Rheenen J., Deryugina E., Friedl P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo // *Semin Cell Dev Biol.* – 2009. – Vol. 20 – P. 931-941.
411. Fang J.Y., Tan S.-J., Wu Y.-C., Yang Z., Hoang B.X., Han B. From competency to dormancy: a 3D model to study cancer cells and drug responsiveness // *Journal of Translational Medicine.* – 2016. – Vol. 14(1). – P. 38.
412. Liu C., Chen L., Wang W., Qin D., Jia C., Yuan M., Wang H., Guo Y., Zhu J., Zhou Y.; et al. Emodin Suppresses the Migration and Invasion of Melanoma Cells // *Biological & pharmaceutical bulletin.* – 2021. – Vol. 44(6). – P. 771-779.
413. Knowles L.M., Gurski L.A., Maranchie J.K., Pilch J. Fibronectin Matrix Formation is a Prerequisite for Colonization of Kidney Tumor Cells in Fibrin // *Journal of Cancer.* – 2015. – Vol. 6(2). – P. 98-104.
414. Shah L., Latif A., Williams K.J., Mancuso E., Tirella A. Invasion and Secondary Site Colonization as a Function of In Vitro Primary Tumor Matrix Stiffness: Breast to Bone Metastasis // *Advanced Healthcare Materials.* – 2023. – Vol. 12(3). – P. 2201898.
415. Di Martino J., Henriët E., Ezzoukhry Z., Mondal C., Bravo-Cordero J.J., Moreau V., Saltel F. 2D and 3D Matrices to Study Linear Invadosome Formation and Activity // *J Vis Exp.* – 2017. – Vol. (124). – P. e54911.
416. Lee A.F., Chen M.C., Chen C.J., Yang C.J., Huang M.S., Liu Y.P. Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12(7). – P. e0180383.
417. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters // *Cell Death Dis.* – 2011. – Vol. 2(7). – P. e179.
418. Ghiso E., Migliore C., Ciciriello V., Morando E., Petrelli A., Corso S., De Luca E., Gatti G., Volante M., Giordano S. YAP-Dependent AXL Overexpression Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in NSCLC // *Neoplasia.* – 2017. – Vol. 19(12). – P. 1012-1021.