

Имитация внеклеточного матрикса на основе полимеров для создания модели микроокружения опухоли.

Polymer-based simulation of extracellular matrix to create a tumor microenvironment model.

О. В. Мамонова^{1,2#}, Д. К. Симакина^{1,2}, Е. В. Терновая^{1,2}, Э. А. Ткаченко¹, М. Ю. Славина^{1,2}, Е. В. Ивановская^{1,2}.

Olga V. Mamonova^{1,2}, Daria K. Simakina^{1,2}, Elizaveta V. Ternovaya^{1,2}, Elina A. Tkachenko¹, Maria Y. Slavina^{1,2}, Ekaterina V. Ivanoskaya^{1,2}

1. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Миусская пл., 9, Москва, Россия, 125047
2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Средняя Калитниковская, д. 30, Москва, Россия, 109029

Автор для переписки: mamonovaolha@yandex.ru

1. D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya pl., 9, Moscow, Russia, 125047
2. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia

Получено: 10.03.2024

Принято к публикации: 24.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: ZRQEJA

Аннотация

Способность раковых клеток отделяться от исходного опухолевого очага и образовывать метастазы связана с их влиянием на внеклеточный матрикс. Важным структурным компонентом является коллаген, способный видоизменяться под действием биохимических сигналов злокачественных клеток. В данной обзорной статье рассматриваются оптимальные биосовместимые полимеры, которые могут быть использованы при создании искусственного внеклеточного матрикса, а также требования, которым они должны соответствовать. Разработка имитации внеклеточного матрикса поможет в исследовании механизма эпителиально-мезенхимального перехода, а также позволит создать модель для тестирования противоопухолевых препаратов *in vitro*. Самыми подходящими для данной задачи стали сшитые полимеры, например, метакрилат желатина, сшитая гиалуроновая кислота, а также коллаген. Для имитации микроокружения опухоли применяют различные технологии сокультивации, которые также зависят от свойств полимерных каркасов.

Ключевые слова: Внеклеточный матрикс, Коллаген, Сокультивация, Метастазы, Полимерный каркас, Метакрилат желатина.

Annotation

The cancer cells ability to separate from the original tumor site and form metastases is associated with their effect on the extracellular matrix. An important structural component of extracellular

matrix is collagen, which can be modified by the biochemical signals of malignant cells. This review article discusses the optimal biocompatible polymers that can be used to create an artificial extracellular matrix, as well as the requirements they must meet. The development of an extracellular matrix simulation will help in the study of the mechanism of the epithelial-mesenchymal transition, and also will be helpful in creation of a model for testing antitumor drugs *in vitro*. Crosslinked polymers, such as gelatin methacrylate, crosslinked hyaluronic acid, and collagen, have become the most suitable for this task. Various co-cultivation technologies are used to simulate the tumor microenvironment, which also depend on the properties of polymer scaffolds.

Key words: Extracellular matrix, Collagen, Co-cultivation, Metastases, Polymer framework, Gelatin methacrylate.

Введение

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой не клеточную трехмерную макромолекулярную сеть, состоящую из коллагена, протеогликанов/гликозаминогликанов, эластина, фибронектина, ламининов и нескольких других гликопротеинов. В этой сложной сети, образованной с помощью рецепторов клеточной адгезии, находятся клетки всех тканей и органов, а также происходят процессы их пролиферации, миграции и дифференцировки. ВКМ постоянно ремоделируется в результате взаимодействия с ферментами в нормальных условиях и при патологии, в том числе старении, травмах,

онкологических и генетических заболеваний [1,2]. Воссоздание ВКМ искусственным путем является сложной задачей в связи с необходимостью точной передачи физико-химических, реологических, биохимических свойств естественного матрикса определенной ткани. Ранее считалось, что на поведение клеток во внеклеточном матриксе влияют исключительно физические факторы, однако сейчас признано, что вклад молекулярного окружения не менее важен [3]. Поэтому, помимо всего прочего, модель внеклеточного матрикса не должна препятствовать взаимодействиям между цитоскелетом, рецептором клетки и самим матриксом, поддерживая при этом клеточную адгезию.

Искусственный ВКМ может применяться в различных областях: в науке при изучении клеточных сигналов, в тканевой инженерии, в медицине и косметологии. Наиболее подходящим для использования является Матригель - солюбилизированный экстракт, полученный из клеток мышины саркомы Энгельброта-Холма-Сворма. Его преимуществами являются биологическая активность, подходящие свойства для образования ацинарных сфероидов, возможность контроля за поведением и морфологией опухолевых клеток [4]. Его изготавливают путем измельчения мышины саркомы, затем ее очищают от растворимых и нерастворимых белков, центрифугируют, промывают трис-буферным физиологическим раствором с pH 7,4 при пониженной температуре и при 37°C гель застывает [5]. Основными недостатками Матригеля является его вариабельность от партии к партии (непостоянство физико-химических и биохимических свойств продукта) и неконтролируемая деградация, которая является ограничивающим фактором при изучении метастазирования рака. Искусственные ВКМ, синтезируемые на основе различных полимеров, лишены этих недостатков. Помимо этого, такие каркасы возможно «настраивать» под требуемые условия, изменяя состав, молекулярную массу, сшивающий агент, плотность сшивки и метод полимеризации [6].

Еще очень важная часть исследований строения и функций ВКМ посвящена процессу заживления ран и предотвращения признаков старения. На данный момент число стареющих людей среди населения становится все больше из-за увеличения продолжительности жизни человека в целом. С возрастом у людей возникает ряд проблем, связанных с изменением структуры ВКМ различных тканей [7]. Поэтому необходимо понимать, как отдельный компонент ВКМ влияет на деформацию всей ткани.

Цель данной статьи заключается в обзоре актуальных источников литературы и их анализе

для выявления оптимальных полимерных гелей, которые могут быть использованы в качестве имитации внеклеточного матрикса.

Строение и состав естественного внеклеточного матрикса

ВКМ состоит из двух составных частей: базовой мембраны (БМ) и интерстициального матрикса (ИМ). В здоровых тканях БМ - структурированная мембрана, которая покрывает эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также отделяет их от интерстициального. ИМ же в свою очередь обеспечивает структурную поддержку нижележащих клеток и регулирует механизмы миграции клеток, клеточной адгезии, ангиогенез, развития и восстановления тканей. Помимо формообразующих элементов, таких как коллаген, фибронектин и эластин, в состав ВКМ входят протеогликаны, гликопротеиды, гиалуроновая кислота и интегрины, обеспечивающие передачу сигналов между клетками, а также другие белки, например, металлопротеиназы, тенасцины и факторы роста, поддерживающие гомеостаз и участвующие в заживлении ран [7,8].

Коллаген является главным компонентом ВКМ и составляет около 30% от общей массы белков в человеческом теле. Существует около 28 типов коллагена, которые в свою очередь делятся на так называемые фибриллярно-образующие коллагены и сетеобразующие коллагены [8]. Сама молекула коллагена является тримерной α -цепью, способной сплетаться в тройную спираль, как показано на рисунках 1a и 1b.

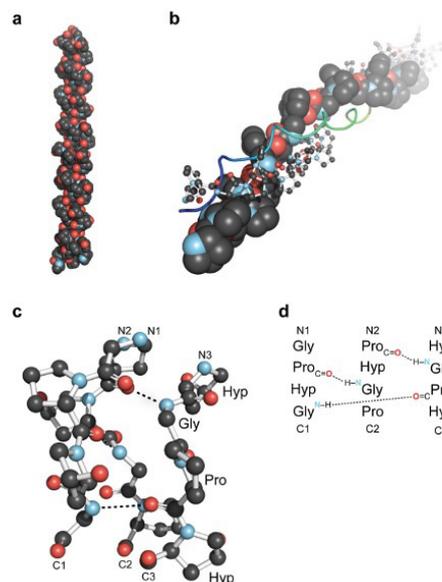


Рисунок 1. Обзор тройной спирали коллагена. (a) Первая кристаллическая структура высокого разрешения тройной спирали коллагена, образованной из (ProHypGly)₄-(ProHypAla)₁(ProHypGly). (b) Вид по оси тройной спирали (ProProGly) с тремя нитями, изображенными в виде заполнения пространства, шара и палочки, а также ленты. (c) Изображение сегмента тройной спирали коллагена в виде шарика и палочки, подчеркивающее лестницу межнитевых водородных связей. (d) Поэтапное расположение трех нитей в сегменте на панели c [9].

Причиной такой структуры является наличие глицина (Gly) в каждом третьем остатке (т. е. повторяющихся пептидных триплетов Gly-X-Y). В этом триплете X часто является пролином, а Y – гидроксипролином (рис. 1с, 1d). Функционирование коллагена зависит от правильной надмолекулярной сборки молекул в агрегат, который включается в матрикс [10]. Фибриллообразующие коллагены составляют большую часть основной массы матрикса – стромы. Коллаген I типа является наиболее распространенным фибриллярным коллагеном и обычно является гетеротримерным (состоит из двух цепей $\alpha 1(I)$ и одной $\alpha 2(I)$); однако было обнаружено, что некоторыми злокачественными клетками вырабатывается изоформа $\alpha 1(I)$, которая устойчива к протеолизу [11].

Во время прогрессирования онкологии гомеостаз ВКМ нарушается, и в зависимости от типа рака меняется структура коллагеновых волокон, эпителиальные клетки оказываются заключенными в строма, богатой коллагеном. Происходит ремодуляция коллагена, которая приводит к нарушению системы передачи биохимических сигналов. Под действием мутировавших генов-супрессоров в раковых клетках регулируется формирование коллагенового пучка, приводящее к наклону волокон от 60° до 90° относительно границы опухоли. Например, клетки рака молочной железы мигрируют *in vivo* вдоль линейаризованных коллагеновых волокон, выстроенных перпендикулярно границе «строма - опухоль». Такая организация волокон увеличивает устойчивость миграции злокачественных клеток, ограничивает доступ Т-клеток к опухоли, повышает плотность ткани вдоль продольной оси, что приводит к понижению прочности на разрыв. При увеличении плотности стромы и давления внутриопухолевой жидкости образуется структура, препятствующая транспортировке терапевтических средств к месту локализации опухоли [11,12].

Помимо изменения структуры ВКМ происходит также его разрушение под действием матриксных металлопротеиназ (ММП). Эти процессы могут происходить как при естественных процессах развития, морфогенеза, ремодуляции и дегградации ткани, так и при патологии. ММП относятся к группе эндопептидаз, ферментативная активность которых определяется ионами Ca^{2+} и Zn^{2+} . Они экспрессируются в клетках соединительной ткани, в первую очередь в фибробластах, а также в нейтрофилах, моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках. Экспрессия ММП поддерживается на постоянном низком уровне и регулируется факторами роста, цитокинами, различными гормонами,

взаимодействиями между клетками и ВКМ, а также физическими факторами, такими как УФ-излучение [13]. Матриксные металлопротеиназы можно разделить на 6 групп: коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13), желатиназы (ММП-2, ММП-9), стромелизины (ММП-3, ММП-10, ММП-11), матрилизины (ММП-7, ММП-26), ММП мембранного типа (ММП-14, ММП-15, ММП-16) и другие неклассифицированные ММП [14,15].

Другим важным составляющим ВКМ являются протеогликаны, обеспечивающие гидратацию тканей, связывание факторов роста, защиту от инфицирования и формирование каркаса [16]. Протеогликаны можно разделить на несколько семейств. Все они имеют белковое ядро, которое покрыто гликозаминогликанами. Первое семейство составляют галектаны (лектиканы), белковое ядро которых имеет N-концевой глобулярный домен, взаимодействующий с гиалуроновой кислотой, и C-концевой домен, который связывает лектины. К этой группе относятся агрекан, версикан, нейрокан и бревикан. Второе семейство протеогликанов характеризуется наличием белкового ядра, состоящего из богатых лейцином повторов. Они создают подковообразную структуру, которая способствует белок-белковым взаимодействиям. Таким образом, данное семейство протеогликанов активно участвует в фибриллогенезе, клеточном росте, апоптозе и ремоделировании тканей. Типичными представителями являются декорин, бигликан, фибромодулин и кератокан [17,18].

Гиалуроновая кислота (ГК) - неотъемлемая часть ВКМ, она является неразветвленным гликозаминогликаном, состоящим из линейно повторяющихся дисахаридов: D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -(1-3) гликозидной связью. ГК естественным образом синтезируется классом интегральных мембранных белков, называемых ГК-синтазами, и разрушается семейством ферментов, называемых гиалуронидазами. ГК выполняет роль каркаса, связывая другие молекулы матрикса. Было установлено, что молекула ГК в зависимости от гидродинамических условий, биохимического окружения и присутствия биополимеров, специфически связывающихся с ГК, может принимать различные структуры *in vivo*. Она участвует в ряде важных биологических процессов, таких как клеточная адгезия, клеточная подвижность, дифференцировка и пролиферация клеток, ангиогенез, заживление ран, митоз, миграция клеток, прогрессия и метастазирование опухолей, воспаление, механическая поддержка тканей, поддержание эластичности соединительных тканей, контроль гидратации тканей и транспорта воды [19].

Ламинины, также входящие в состав

ВКМ, представляют собой гетеротриммеры, состоящие цепей α , β и γ [20]. Одной из общих и наиболее важных функций ламининов является взаимодействие с рецепторами, закрепленными в плазматической мембране клеток, регулирующее множество клеточных действий и сигнальных путей. Изоформы ламинина синтезируются самыми разными клетками в зависимости от специфичности ткани, это могут быть эпителиальные, эндотелиальные клетки, нервы, клетки костного мозга, а также гладкие, скелетные и сердечные мышцы [21].

Помимо перечисленных компонентов для ВКМ также важны эластин и фибронектин – белки, поддерживающие эластичность и прочность ткани, а также обеспечивающие пролиферацию, миграцию и дифференцирование клеток. Фибронектин (ФН) структурно представляет собой белковый димер, в котором два почти идентичных мономера соединены парой С-концевых дисульфидных связей, а каждая субъединица ФН состоит из гомологичных повторов трех типов модулей (FNI, FNII, FNIII). Эластин, обеспечивающий механическую прочность тканей, состоит из матрицы сшитого тропоэластина, на долю которого приходится 80% гидрофобных участков, например, общая повторяющаяся последовательность валина, пролина, глицина, аланина [22].

Нерастворимый эластин трудно использовать в качестве биоматериала, поскольку его структура содержит широкий спектр сшитых доменов. Однако эластин-подобные полипептиды (ELPs) представляют собой класс пептидных полимеров, полученных из гидрофобных остатков человеческого тропоэластина, и могут применяться в биоинженерии. ELPs не только демонстрируют биосовместимость, включая удовлетворяющие механические и вязкоупругие свойства, но и улучшают адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток [23].

Требования к искусственному ВКМ

Для того, чтобы культуры клеток, попадая в искусственный ВКМ, могли прикрепляться, расти и дифференцировать, полимерные каркасы должны обладать определенной прочностью, размером пор и правильными физико-химическими свойствами поверхности. Полимеры должны быть совместимы с культурами клеток, а также со средой для культивирования, не обладать цитотоксичностью. Для каждой ткани механические и физико-химические свойства ВКМ разные и определяются продуктами, выделяющимися в результате жизнедеятельности клеток. На искусственных матриксах выращивают клетки печени, костную и хрящевую ткань, кожу и мезенхимальные стромальные клетки (МСК) [24].

В отличие от децеллюляризованного ВКМ,

полимерные каркасы имеют относительное постоянство физико-химических показателей, таких как вязкость, размер пор, химический состав, скорость деградации. При соблюдении определенных условий (температура, влажность, интенсивность УФ-излучения в случае фотополимеризации) постоянными при проведении реакций полимеризации возможно достичь минимальные отклонения в структуре искусственного ВКМ, что дает возможность использовать его в качестве платформы для тестирования лекарственных препаратов [25].

При анализе источников литературы были выявлены основные реологические характеристики, которые следует учитывать при приготовлении искусственного ВКМ. Ключевыми параметрами при приготовлении каркаса являются вязкость, которая может оцениваться с помощью определения скорости сдвига [26,27], и модуль упругости, определяющийся путем испытаний на релаксацию при сжатии в ограниченном пространстве. Для этого используют прибор с параллельно компрессионными пластинами [26,28]. Для различных тканей существуют определенные реологические показатели. Например, для рассматриваемого ранее рака молочной железы, вязкоупругость тканей должна составлять 0.167–29 кПа, что достигается при использовании гелей на основе метакрилата желатина (GelMA) в 10% концентрации – результаты испытания на сжатие были в диапазоне 0,36-1,42 кПа [28,29].

Вязкость полимерного матрикса зависит от множества факторов, таких как температура, при которой проводилась полимеризация, концентрация полимера и его молекулярная масса. Также было выдвинуто предположение, что низкая вязкость приводит к более мелкой структуре пор геля [30]. Поры в геле должны быть связаны между собой, а их объем не препятствовать миграции и пролиферации клеток. Крупнопористые каркасы обеспечивают лучший доступ питательных веществ к клеткам, диффузию газов и удаление метаболитов, но могут приводить к слабой адгезии клеток. Мелкопористые структуры не препятствуют взаимодействию клеток с матриксом, поэтому обычно используются в тканевой инженерии в целях васкуляризации. Для фибробластов большой размер пор геля (от 50 до 90 мкм) не является препятствием для пролиферации, так как их распространение идет путем перемычек, в то время как для клеток эндотелия более предпочтителен меньший размер пор (5-40 мкм) [31]. При использовании желатина, сшитого с помощью генипина (натурального сшивающего агента), и варьировании температуры порообразования, удалось получить аналог

хрящевой ткани [32].

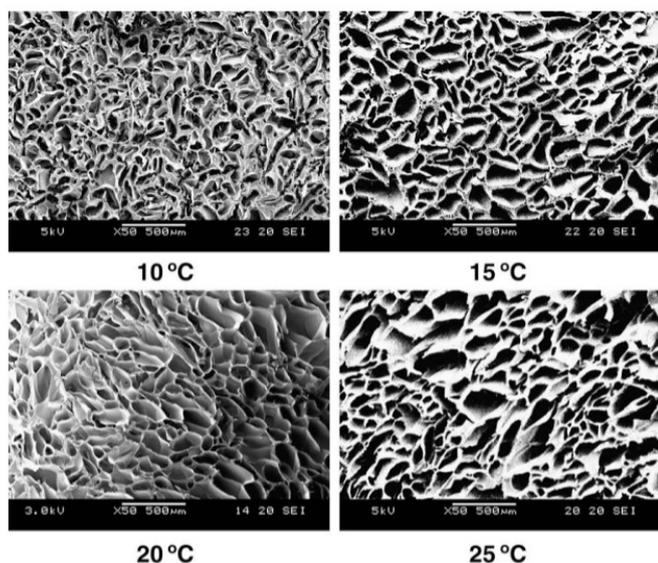


Рисунок 2. SEM-структура скаффолдов, сшитых при разных температурах. Зависимость размера пор от температуры образования: при увеличении температуры полимеризации размер пор [32].

На рисунке 2 показано как зависит размер пор от температуры порообразования. При увеличении температуры полимеризации растет и размер пор.

Способность к набуханию полимера также является важным параметром для имитации ВКМ. Она способствует транспортировке питательных веществ и метаболитов. Способность к поглощению также влияет на поддержание прочности каркаса. Скорость набухания можно рассчитать по формуле:

$$Swelling\ rate = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} * 100\%$$

где W_{wet} , W_{dry} – вес влажного и сухого скаффолда соответственно.

Биодеградация скаффолдов тоже важная характеристика, которая позволяет сравнить искусственный ВКМ с естественным и тем самым подобрать оптимальные концентрации полимера и сшивающего агента. Скорость деградации каркаса должна быть сопоставима с установленным временем культивирования так, чтобы структура матрикса оставалась целостной необходимый период [33]. Для оценки скорости деградации можно использовать ферменты, разрушающие полимер, из которого изготовлен ВКМ. Например, для скаффолда из коллагена используют раствор коллагеназы в фосфатном буфере: сначала измеряют вес высушенных коллагеновых матриксов (W_0), затем оставляют их в инкубаторе при 37 °C на 7 дней в растворе фермента, а после промывают и высушивают. Массы скаффолдов после реакции с ферментом и сушки (W) оцениваются каждый день с момента инкубации [34]. Рассчитывается скорость

деградации по формуле:

$$Degradation\ rate = \frac{W_0 - W}{W} * 100\%$$

Культивирование клеток на ВКМ с искусственным полимерным каркасом обеспечивается при использовании среды для культивирования. Для различных клеточных линий следует использовать подходящие для них среды [35]. Однако в контексте рака молочной железы, который не раз уже упоминался в данном обзоре, как для обычного культивирования раковых клеток, так и для со-культивации с фибробластами можно использовать среду DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS - fetal bovine serum) и 1% антибиотика [36,37]. **Наиболее подходящие полимеры для имитирования ВКМ**

Основными требованиями к искусственному ВКМ являются биосовместимость и нетоксичность полимера, из которого будет изготовлен каркас. Под данные условия подходят природные полимеры, такие как гиалуроновая кислота, коллаген, желатин, хитозан, фибрин, полигидроксиалканат, альгиновая кислота [38]. Для придания полимерам требуемые для 3D культивирования механические и физико-химические свойства применяют сшивающие агенты.

Одним из часто используемых природных полимеров, который применяется для создания каркаса искусственного ВКМ, является желатин – гидролизованный коллаген. В число его преимуществ входит дешевизна и простота в применении. Для химической сшивки полимера могут быть использованы EDC-NHS (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид в сочетании с N-гидроксисукцинимидом), скваровая кислота (СК) и диальдегидный крахмал (ДАК). Данные сшивающие агенты обладают малой цитотоксичностью и биосовместимы. Также может быть использован генипин, однако его применяют редко из-за высокой стоимости [39]. Применение сшивающих агентов повышает температуру плавления и механическую прочность геля желатина, тем самым приближая его свойства к свойствам естественной ткани [40].

Метакрилат желатина или GelMA, полученный путем фотосшивания желатина с метакриловым ангидридом, широко используется для биопечати тканевой инженерии благодаря своей устойчивости и биосовместимости. Его можно по-разному модифицировать, добавляя другие сшивающие агенты или сшивая с другими полимерами, например, с гиалуроновой кислотой [41]. Особенность работы с гелями, для отверждения которых требуется УФ-излучение, заключается

в наличии малых долей непрореагировавших радикалов, которые обладают цитотоксичностью. Для предотвращения негативных условий для культивирования интенсивность УФ-излучения, время его воздействия и концентрацию фотоинициатора тщательно рассчитывают. Наиболее биосовместимыми и неиммуногенными фотоинициаторами являются 2-гидрокси-40-(2-гидроксиэтокси)-2-метилпропиофенон (IC-2959) и литийфенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат (LAP) [42].

Гиалуроновая кислота является перспективным полисахаридом, используемым для тканевой инженерии, регенерации ткани и ее увлажнения. Гидрогели на ее основе могут применяться в инженерии нервной ткани и тканей мозга, так как не препятствуют миграции стволовых нервных клеток и обеспечивают передачу сигналов между ними. Важным является то, что данный гидрогель должен быть дополнен ламинином, так как нервные клетки не способны к адгезии на гиалуроновой кислоте [43]. Для улучшения клеточной адгезии для гидрогелей ГК возможно также использование аргинилглициласпарагиновой кислоты (RGD – последовательность), фибриногена и других белков адгезии [44].

Как было сказано ранее, огромную роль в структурообразовании внеклеточного матрикса играет фибриллярный коллаген первого типа. Естественный коллаген обладает высокой прочностью на разрыв и протеолитической устойчивостью благодаря межмолекулярным водородным связям, что делает его подходящим полимером для 3D культивирования. Однако, как и другие белки, со временем коллаген теряет свои механические свойства и бесконтрольно разрушается. Поэтому для создания искусственных матриксов используют сшивающие агенты [45]. Если рассматривать химическое сшивание, то для обеспечения биосовместимости используются агенты, которые в результате реакции не оставляют цитотоксичного электрофильного вещества и не выделяют его при деградации. Например, добавление хитозана в реакцию коллагена с глутаровым альдегидом увеличивает эффективность сшивки, тем самым снижая цитотоксичность конечного продукта [46].

Требуемую структуру внеклеточного матрикса можно обеспечить и при помощи физических методов, например, электроспиннинга коллагеновых волокон. За счет воздействия электромагнитного поля на волокна, структуру внеклеточного матрикса можно контролировать, делая ее специфичной для каждой ткани, а также делать ее более стабильной на счет физической сшивки полимерных нитей [47,48]. Биопринтинг 3D матриксов на основе коллагена первого

типа также применяется в инженерии тканей и позволяет создавать более сложные структуры [49].

Среди рассмотренных биополимеров наиболее подходящими для 3D культивирования являются коллаген и желатин, так как наиболее похожи по структуре и составу на естественный ВКМ. Из-за отсутствия тримерных цепей желатин уступает в своей способности проводить клеточные сигналы и обеспечивать взаимодействия клеток с матриксом коллагену. Правда, сшитые метакриловым ангидридом данные полимеры хорошо проявили себя в обеспечении пролиферации культивируемых на них клеток [50,51]. Так как данные гидрогели часто используются в биопринтинге, GelMA стал наиболее востребованным благодаря его стабильности, дешевизне и биосовместимости. Метакрилат коллагена, созданный по аналогии с GelMA, менее устойчив к механическому воздействию и более токсичен за счет низкой конверсии метакрилового ангидрида, однако, данные недостатки были нивелированы за счет снижения температуры синтеза до 4 °C и подкисления растворителя. В результате полученный гель обеспечил лучшую экспрессию генов и пролиферацию клеток, чем метакрилат желатина, однако, механические свойства гидрогеля еще требуют усовершенствования [52].

Методы и способы применения ВКМ для со-культивации

Для того, чтобы выращивать одновременно две культуры используют различные методы образования сфероидов клеток для воссоздания естественного положения опухоли в ткани. Образование сфероидов может осуществляться разными методами. Один из них - метод висячей капли (рис. 3а), основанный на поверхностном натяжении. В ходе данного опыта требуется внести аликвоту клеточной суспензии в лунку планшета, а затем перевернуть его так, чтобы образовалась висячая капля с клетками. Этот метод является самым ранним из представленных и самым простым, так как требует меньше вспомогательных веществ. Однако [53]. Другой метод - forced floating method (рис.3б), является более затратным и основан на применении сосуда со стенками, к которым клетки не способны прикрепляться. Также можно использовать агенты, препятствующие адгезии, например, среду для культивирования с добавлением метилцеллюлозы [54]. Данные агенты не ограничивают возможность клеток образовывать агрегаты, а в дальнейшем и сфероиды. Размер сфероидов может контролироваться за счет изменения количества внесенных клеток. Также существует похожий метод - агрегационный (рис.3с), основанный на перемешивании суспензии

клеток в аппарате с не адгезионными стенками. В данном методе размеры сфероидов варьируются за счет спонтанной агрегации и столкновения клеток, что в перспективе тестирования лекарственных средств будет негативно влиять на воспроизводимость экспериментов [55].

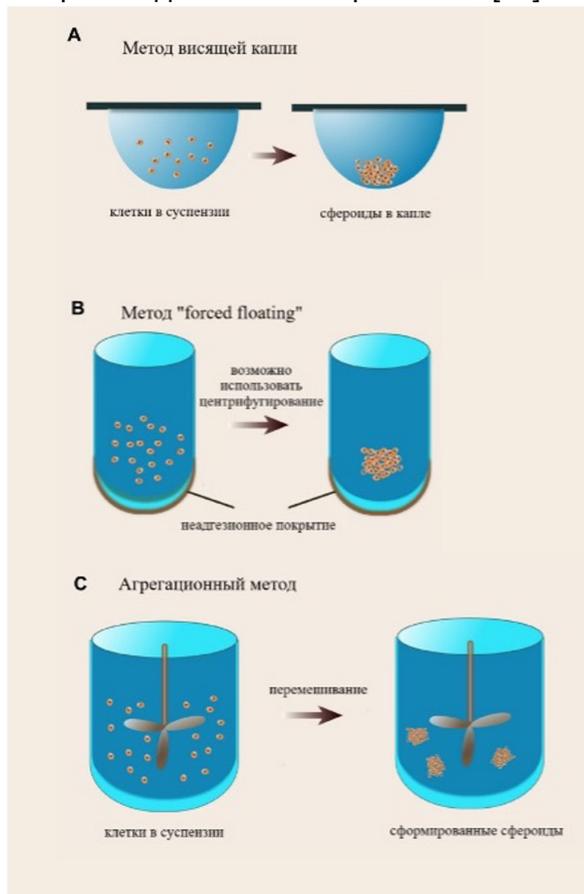


Рисунок 3. Методы формирования клеточных сфероидов [56].

Формирование клеточных сфероидов необходимо в случае культивирования на 3D матрице опухолевых клеток и МСК. Если же требуется внести в матрикс фибробласты или макрофаги, то их изначально требуется смешать с раствором несшитого полимера, а затем подвергнуть фотосшиванию. После формирования геля сверху вносится суспензия опухолевых клеток [56].

В естественном ВКМ, как было описано ранее, содержатся необходимые белки, обеспечивающие адгезию, пролиферацию, дифференцировку, экспрессию генов и передачу сигналов. При со-культивации с другими клеточными линиями, например, с фибробластами, которые синтезируют множество необходимых элементов ВКМ, клетки опухоли смогут взаимодействовать со своим микроокружением [57].

Со-культивация на гидрогеле из GelMA клеток меланомы и фибробластов была приведена в статье Миаобэна Ву [58]. В раствор-предшественник метакрилата желатина (до фотосшивания), содержащий среду для культивирования, вносилась

суспензия фибробластов, после чего гель подвергался отверждению УФ-излучением (405 нм). Получающийся в лунках цилиндр из GelMA и фибробластов далее вносили в 24 луночный планшет, где находилась среда для культивирования. Сверху наносилась суспензия с клетками меланомы. Результаты показали, что скорость пролиферации клеток меланомы в со-культивации с фибробластами оказалась выше, чем в GelMA без фибробластов. Также были обнаружены маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, что является признаком преобладания миграционных и инвазивных свойств. Были сделаны выводы о взаимном влиянии клеток меланомы и фибробластов.

Заключение

В ходе обзора литературы были подробно изучены основные компоненты ВКМ: коллаген, матриксные металлопротеиназы, протеогликаны, эластин, фибронектин, ламинин, гиалуроновая кислота. Было выявлено, что структура коллагена изменяется при прогрессировании онкологии. Под действием мутировавших генов в раковых клетках коллагеновые волокна выстраиваются перпендикулярно границе опухоли и уплотняются, тем самым обеспечивая устойчивость к миграции злокачественных клеток. Такая линейризация коллагена ограничивает доступ Т-клеток к опухоли и препятствует связыванию лекарственного средства с мишенью. Для имитации ВКМ возможно применение как свободных природных полимеров, например, коллаген, так и сшитых специальными агентами, например, метакрилат желатина (GelMA), сшитая гиалуроновая кислота, метакрилат коллагена. Важно, чтобы матрицы на основе полимеров совпадали по вязкоупругим свойствам, прочности на сжатие и на разрыв с естественными реологическими показателями ткани, а размеры пор гидрогелей не препятствовали клеточной пролиферации и адгезии. Применение искусственного ВКМ на основе сшитых полимеров при со-культивации культур опухолевых клеток и фибробластов является перспективной задачей. Если удастся получить сшитый полимерный гель, способный к контролируемой деградации и обеспечивающий передачу сигналов между клетками, то появится возможность тестировать противоопухолевые препараты на модели естественного микроокружения опухоли.

Список литературы

1. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
2. Cheong S, Peng Y, Lu F, He Y. Structural extracellular matrix-mediated molecular signaling

- in wound repair and tissue regeneration. *Biochimie* 2024;S030090842400230X. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.10.003>.
3. Bandzerewicz A, Gadomska-Gajadur A. Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells* 2022;11:914. <https://doi.org/10.3390/cells11050914>.
 4. Tamayo-Angorrilla M, López De Andrés J, Jiménez G, Marchal JA. The biomimetic extracellular matrix: a therapeutic tool for breast cancer research. *Transl Res* 2022;247:117–36. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.11.008>.
 5. Passaniti A, Kleinman HK, Martin GR. Matrigel history/background, uses, and future applications. *J Cell Commun Signal* 2022;16:621–6. <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00643-1>.
 6. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* 2020;5:539–51. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>.
 7. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng* 2014;5:2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>.
 8. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:115. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>.
 9. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
 10. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339:247–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.
 11. Ouellette JN, Drifka CR, Pointer KB, Liu Y, Lieberthal TJ, Kao WJ, et al. Navigating the Collagen Jungle: The Biomedical Potential of Fiber Organization in Cancer. *Bioengineering* 2021;8:17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8020017>.
 12. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med* 2019;17:309. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>.
 13. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016;31:177–83. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>.
 14. Goodarzi K, Rao SS. Structurally decoupled hyaluronic acid hydrogels for studying matrix metalloproteinase-mediated invasion of metastatic breast cancer cells. *Int J Biol Macromol* 2024;277:134493. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134493>.
 15. Kwon MJ. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. *Front Oncol* 2023;12:1108695. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1108695>.
 16. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015;42:11–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
 17. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003;200:423–8. <https://doi.org/10.1002/path.1437>.
 18. Suhovskih AV, Grigorieva EV. Proteoglycans in normal physiology and carcinogenesis. *Adv Mol Oncol* 2018;5:8–25. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-1-8-25>.
 19. Al-Khateeb R, Prpic J. Hyaluronic Acid: The Reason for Its Variety of Physiological and Biochemical Functional Properties. *Appl Clin Res Clin Trials Regul Aff* 2019;6:112–59. <https://doi.org/10.2174/2213476X06666190405094637>.
 20. Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhes Migr* 2013;7:56–63. <https://doi.org/10.4161/cam.21831>.
 21. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhes Migr* 2013;7:48–55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>.
 22. Park B-H, Jeong E-S, Lee S, Jang J-H. Bio-functionalization and in-vitro evaluation of titanium surface with recombinant fibronectin and elastin fragment in human mesenchymal stem cell. *PLOS ONE* 2021;16:e0260760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260760>.
 23. Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. *Trends Biotechnol* 2020;38:280–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.005>.
 24. Porwal S, Sridhar SB, Talath S, Wali AF, Warsi MH, Malviya R. 3D printable sustainable hydrogel formulations for tissue engineering applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 2024;101:106308. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106308>.
 25. Kaemmerer E, Melchels FPW, Holzapfel BM, Meckel T, Huttmacher DW, Loessner D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* 2014;10:2551–62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.035>.
 26. Silva-Correia J, Gloria A, Oliveira MB, Mano JF, Oliveira JM, Ambrosio L, et al. Rheological and mechanical properties of acellular and cell-laden methacrylated gellan gum hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:3438–46. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34650>.
 27. Kardas P, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Bornstein MM, Waltimo T. Bacterial extracellular polymeric substances as potential saliva substitute. *FEMS Microbiol Lett* 2022;369:fnac028. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac028>.
 28. Arya AD, Hallur PM, Karkisaval AG, Gudipati A, Rajendiran S, Dhavale V, et al. Gelatin Methacrylate Hydrogels as Biomimetic Three-Dimensional Matrixes for Modeling Breast Cancer Invasion and Chemoresponse in Vitro. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:22005–17. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06309>.

29. McKee CT, Last JA, Russell P, Murphy CJ. Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:155–64. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0520>.
30. Florczyk SJ, Kim D, Wood DL, Zhang M. Influence of processing parameters on pore structure of 3D porous chitosan–alginate polyelectrolyte complex scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2011;98A:614–20. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33153>.
31. Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: Haycock JW, editor. *3D Cell Cult.*, vol. 695, Totowa, NJ: Humana Press; 2011, p. 17–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2.
32. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5:670–9. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>.
33. Milojević M, Harih G, Vihar B, Vajda J, Gradišnik L, Zidarič T, et al. Hybrid 3D Printing of Advanced Hydrogel-Based Wound Dressings with Tailorable Properties. *Pharmaceutics* 2021;13:564. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040564>.
34. Kaczmarek-Szczańska B, Polkowska I, Małek M, Kluczyński J, Paździor-Czapula K, Wekwejt M, et al. The characterization of collagen-based scaffolds modified with phenolic acids for tissue engineering application. *Sci Rep* 2023;13:9966. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37161-6>.
35. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 1st ed. Wiley; 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>.
36. Chiew GGY, Wei N, Sultania S, Lim S, Luo KQ. Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnol Bioeng* 2017;114:1865–77. <https://doi.org/10.1002/bit.26297>.
37. Sung H-W, Huang D-M, Chang W-H, Huang R-N, Hsu J-C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:520–30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990915\)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9).
38. Kim B-S, Park I-K, Hoshiba T, Jiang H-L, Choi Y-J, Akaike T, et al. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2011;36:238–68. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.10.001>.
39. Skopinska-Wisniewska J, Tuszyńska M, Olewnik-Kruszkowska E. Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials* 2021;14:396. <https://doi.org/10.3390/ma14020396>.
40. Kuijpers AJ, Engbers GHM, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:225–43. <https://doi.org/10.1163/156856200743670>.
41. Duchi S, Onofrillo C, O'Connell CD, Blanchard R, Augustine C, Quigley AF, et al. Handheld Co-Axial Bioprinting: Application to in situ surgical cartilage repair. *Sci Rep* 2017;7:5837. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05699-x>.
42. Kurian AG, Singh RK, Patel KD, Lee J-H, Kim H-W. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics. *Bioact Mater* 2022;8:267–95. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.027>.
43. Nelson DW, Gilbert RJ. Extracellular Matrix-Mimetic Hydrogels for Treating Neural Tissue Injury: A Focus on Fibrin, Hyaluronic Acid, and Elastin-Like Polypeptide Hydrogels. *Adv Healthc Mater* 2021;10:2101329. <https://doi.org/10.1002/adhm.202101329>.
44. Zaviskova K, Tukmachev D, Dubisova J, Vackova I, Hejcl A, Bystronova J, et al. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:1129–40. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36311>.
45. Chattopadhyay S, Raines RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014;101:821–33. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>.
46. Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, et al. Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol* 1992;14:129–38. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80002-9).
47. Blackstone BN, Gallentine SC, Powell HM. Collagen-Based Electrospun Materials for Tissue Engineering: A Systematic Review. *Bioengineering* 2021;8:39. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8030039>.
48. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* 2002;3:232–8. <https://doi.org/10.1021/bm015533u>.
49. Osidak EO, Kozhukhov VI, Osidak MS, Domogatsky SP. Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *Int J Bioprinting* 2024;6:270. <https://doi.org/10.18063/ijb.v6i3.270>.
50. Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, et al. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15:664–79. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>.
51. Khan OF, Sefton MV. Patterning Collagen/Poloxamine-Methacrylate Hydrogels for Tissue-Engineering-Inspired Microfluidic and Laser Lithography Applications. *J Biomater Sci Polym Ed* 2011;22:2499–514. <https://doi.org/10.1163/092050610X540693>.
52. Shi H, Li Y, Xu K, Yin J. Advantages of photo-curable collagen-based cell-laden bioinks compared to methacrylated gelatin (GelMA) in digital light processing (DLP) and extrusion bioprinting. *Mater Today Bio* 2023;23:100799.

<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100799>.

53. Stadler M, Walter S, Walzl A, Kramer N, Unger C, Scherzer M, et al. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2015;35:107–24. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.08.007>.
54. Leung BM, Leshner-Perez SC, Matsuoka T, Moraes C, Takayama S. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomater Sci* 2015;3:336–44. <https://doi.org/10.1039/C4BM00319E>.
55. Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. *SLAS Discov* 2011;16:1119–24. <https://doi.org/10.1177/1087057111419501>.
56. He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, Yan S, et al. 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget* 2018;9:1326–45. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19847>.
57. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:655–63. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
58. Wu M, Yu E, Ye K, Huang Y, Ren T, Guo M, et al. Evaluation of the Effect of Fibroblasts on Melanoma Metastasis Using a Biomimetic Co-Culture Model. *ACS Biomater Sci Eng* 2023;9:2347–61. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c01186>.