

УДК 57.086.86;576.54

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОХИРУРГИИ СФЕРОИДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ

© 2017 г. Н. В. Кошелева^{а, с, *}, И. В. Ильина^б, К. В. Кожина^а, И. М. Зурина^а, А. Е. Роскова^с,
А. А. Горкун^а, А. В. Овчинников^б, М. Б. Агранат^б, С. Г. Морозов^а, И. Н. Сабурин^{а, д}

^аФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии”
125315, Москва, Балтийская ул., д. 8

^бФГБУ науки Объединенный институт высоких температур РАН
125412, Москва, Ижорская ул., д. 13, стр. 2

^сМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

^дФГБОУ ДПО “Российская медицинская академия последипломного образования” Минздрава России
123995, Москва, Баррикадная ул, д. 2/1, стр. 1

*E-mail: n_kosheleva@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

В настоящем исследовании для разработки новой простой воспроизводимой модели с целью изучения механизмов репарации и регенерации *in vitro* были применены современные методы лазерной микрохирургии клеточных сфероидов. Для этого с помощью наносекундного лазерного скальпеля осуществляли микродиссекцию поверхностной и внутренней зон сфероидов из дермальных фибробластов. Для эффективной диссекции с сохранением жизнеспособности сфероида были подобраны оптимальные параметры: длина волны 355 нм, частота 100 Гц, длительность импульсов 2 нс диапазон энергии лазерных импульсов 7–9 мкДж. После нанесения повреждения наблюдали нарушение структуры сфероидов и расхождение краев раневой поверхности на угол более 180°. Уже в течение первого часа после воздействия на сфероиды лазерным излучением форма выживших после повреждения клеток изменялась – клетки на поверхности сфероида и непосредственно в области повреждения становились округлыми. Через сутки после микродиссекции структура сфероида начинала частично восстанавливаться, клетки в поверхностных слоях начинали принимать исходную уплощенную форму, дебрис из погибших поврежденных клеток и их фрагментов постепенно исключался из состава сфероида. На предложенной модели получены первые данные по стимуляции восстановления структуры поврежденных сфероидов из дермальных фибробластов синтетическим пептидом Р199, который применяют в косметологии для инициации антивозрастных и регенерационных эффектов в коже. После микродиссекции восстановление структуры сфероидов из фибробластов с несколькими поверхностными слоями уплощенных черепицеобразно расположенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны в присутствии пептида Р199 происходило быстрее, чем в контрольной группе, и завершалось в течение 7 сут, предположительно за счет ремоделирования выживших клеток.

Ключевые слова: лазерная микрохирургия, сфероиды фибробластов, наносекундный лазерный скальпель, репарация клеточных сфероидов

DOI: 10.7868/S0475145017010074

ВВЕДЕНИЕ

Регенерация – процесс, направленный на восстановление утраченных при повреждении частей организма, проходит на разных уровнях организации – клеточном, тканевом, органном, организменном. Механизмы регенерации консервативны, однако способность полноценно восстанавливать повреждения в эволюционном ряду падает и у млекопитающих практически утрачивается (Bely, 2010). В последние годы клетки, вы-

ращиваемые *in vitro*, все чаще рассматривают как модель не только для исследования цитотоксичности или лекарственной эффективности иммунобиологических, лекарственных или косметических препаратов (Колокольцова и др., 2014), но и для изучения процессов репарации и регенерации. При этом исследователи активно переходят от 2D к 3D условиям культивирования, поскольку физиологические свойства и пролиферативная активность клеток в трехмерных системах *in vitro*

ближе к условиям *in vivo* (Haycock, 2011). В 3D культурах клетки растут, взаимодействуя с окружающими клетками, внеклеточным матриксом и внешней средой во всех трех измерениях (Pampaloni et al., 2013; Antoni et al., 2015; Kubatiev et al., 2015). Клеточные сфероиды, трехмерные самоорганизующиеся сферические агрегаты клеток, являются одной из популярных систем для трехмерного моделирования *ex vivo*. Организация сфероидов приближена к организации тканей *in vivo* с комплексом межклеточных контактов и контактов с вновь синтезированным внеклеточным матриксом (Lin, Chang, 2008). Большинство клеток в неадгезивных условиях обладают способностью к спонтанной агрегации, уже описаны общие закономерности формирования сфероидов из клеток эпителиального и мезенхимного фенотипов (Repin et al., 2014).

В настоящее время одним из актуальных направлений для применения клеточных сфероидов, как модельной системы *in vitro*, может стать изучение механизмов заживления ран. Моделирование раны *in vitro* на монослойных культурах позволяет изучать лишь отдельные параметры поведения клеток, такие как скорость миграции и пролиферации, но не учитывает вклад трехмерных пространственных межклеточных взаимодействий и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом. Поэтому чаще заживление ран моделируют на животных *in vivo* или на органотипических культурах эксплантатов *ex vivo* (Gottrup et al., 2000; Antoni et al., 2015). Но поиски доступной воспроизводимой модельной системы для исследования механизмов регенерации и репарации продолжаются. Репарация клеточных сфероидов после повреждающего воздействия может стать одной из таких моделей. В настоящей работе для моделирования повреждений сфероидов предлагается использовать методы лазерной микрохирургии.

В современной биологии и медицине распространены лазерные микродиссекторы на основе импульсных лазеров. С их помощью становится возможной микрохирургия не только на тканевом, но и на клеточном и даже субклеточном уровнях (Magidson et al., 2007). Самые распространенные источники лазерного излучения фемтосекундной длительности обеспечивают высокое пространственное и временное разрешение и характеризуются большой глубиной проникновения. С помощью фемтосекундных лазерных систем были продемонстрированы возможности успешной диссекции ядер и инактивации органелл (Heistercamp et al., 2005; Shen et al., 2005), решены задачи избирательной доставки внеклеточных веществ в клетки — оптоинъекция и трансфекция (Stevenson et al., 2007; Uchugonova et al., 2008; Pina et al., 2013; 2014). В последнее время продемонстрированы возможности успешной микрохирургии внутриклеточных структур с помощью наносекундных (Khodjakov et al.,

2004; Magidson et al., 2007) и пикосекундных лазерных систем (Colombelli et al., 2005) с точностью сравнимой с фемтосекундными системами (Sacconi et al., 2005).

Помимо двумерных структур — монослоев клеток, методы лазерной микрохирургии были опробованы и на трехмерных объектах — эмбрионах различных организмов и сфероидах. Так, лазерные диссекторы применяли для формирования отверстия в оболочке ооцита при проведении искусственного оплодотворения или биопсии поллярного тельца (Clement-Sengewald et al., 1996), для вспомогательного хэтчинга и диссекции клеток трофобласта при биопсии на поздних сроках преимплантационного развития (Pina et al., 2015, 2016). Но эмбрионы служат удобными моделями для ограниченного круга задач. В свою очередь клеточные сфероиды в качестве модельных объектов позволяют заполнить своеобразный “провал” между живыми тканями и двумерными структурами *in vitro*, что создает предпосылки к разработке моделей на основе лазерной микрохирургии сфероидов. Несмотря на это, в настоящее время существует лишь несколько работ, в которых для изучения сфероидов применяли лазерные технологии. Эти работы посвящены методикам визуализации сфероидов и их дифференцировке (Pina et al., 2011; König et al., 2011; Bruns et al., 2012; Pampaloni et al., 2013) методикам воздействия и локального повреждения сфероидов (Uchugonova et al., 2007; Kosheleva et al., 2016). На настоящий момент малоизученным остается процесс репарации сформированных клеточных сфероидов при более масштабных, “неточечных” повреждениях.

Кожа — орган, который выполняет барьерную функцию и наиболее часто подвергается повреждающему воздействию (физическому, механическому и т.д.) окружающей среды, в связи с чем обладает большим регенеративным потенциалом. Ключевыми клеточными элементами, которые участвуют в морфогенезе и динамическом ремоделировании дермы, включая синтез белков и металлопротеиназ внеклеточного матрикса, являются фибробласты (Jenkins, 2002; Makrantonaki, Zouboulis, 2007). Поэтому в настоящем исследовании для разработки модели изучения репарации были использованы 3D культуры дермальных фибробластов человека.

В косметологии для репарации дефектов кожи и борьбы с возрастными изменениями активно применяют биологически активные препараты, стимулирующие пролиферативную и синтетическую активность, прежде всего фибробластов. Подобные препараты могут представлять собой цитокины, клеточные экстракты или синтетические пептиды. Разрабатываемая в нашем исследовании модель может стать удобной тест-систе-

мой для проверки их биологической активности. Поэтому мы использовали синтетический пептид P199, являющийся основным компонентом препарата, применяемого в косметологии для стимуляции регенерации и омоложения кожи (Петриковский, 2012).

Целью настоящего исследования стало создание доступной и воспроизводимой модели повреждения клеточных сфероидов с применением методов лазерной микрохирургии. Исследование было проведено на сфероидах из фибробластов кожи человека. Для моделирования повреждений сфероидов использовали наносекундный лазерный диссектор. На разработанной модели было проведено пилотное исследование влияния добавления синтетического пептида P199 на репарацию повреждения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Монослойная 2D культура фибробластов дермы кожи человека

В эксперименте использовали первичные культуры фибробластов человека. Клетки выделяли из двух биоптатов кожи человека, забранных с информированного согласия доноров с соблюдением правил этики, закона об охране здоровья граждан и с соблюдением правил асептики. Выделение культур осуществляли путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки биоптатов 0.25% раствором трипсина. Клетки культивировали на чашках Петри в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1 : 1, БиолоТ, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамин (2 мМ/л, ПанЭко, Москва), гентамицин (50 мкг/мл, ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Смену полной ростовой среды осуществляли 2–3 раза в неделю. Фенотип клеток и степень конfluентности контролировали с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), в видимом световом диапазоне; фоторегистрацию осуществляли цифровой камерой DeltaPix Viewer (Olympus, Япония). При достижении культурой 70% конfluентности, клетки пассировали.

Для анализа пролиферации культур клеток, с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США) производили подсчет общего числа клеток в течение 48 часов культивирования в трех повторностях. Индекс пролиферации (IP) вычисляли по формуле: $IP = N_{48}/N_0$, где N_{48} – количество клеток через 48 ч культивирования, а N_0 – через 0 ч культивирования.

3D культивирование, клеточные сфероиды

Из монослойных 2D культур 4-го пассажа получали 3D культуры фибробластов – клеточные сфероиды с использованием специальных агарозных планшетов с лунками (Microtissue, США), посевная концентрация составила 250 тыс. кл./мл. Агарозные планшеты помещали в 12-луночный культуральный планшет и культивировали в течение 7 сут в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в полной ростовой среде.

В последующем эксперименте сфероиды разделяли на три группы: 1) поврежденные лазерным диссектором сфероиды, которые после воздействия культивировали на агарозных планшетах в присутствии пептида P199 (15 нг/мл, ПремьерФарма, Москва) в течение 7 сут; 2) поврежденные лазерным диссектором сфероиды, которые после повреждения культивировали на агарозных планшетах 7 сут в полной ростовой среде без добавок; 3) интактные контрольные сфероиды, которые культивировали на агарозных планшетах в полной ростовой среде.

Для стимуляции репарации сфероидов в экспериментальной группе к ростовой среде добавляли синтетический пептид P199 из 72 аминокислот, молекулярная масса 8.4 кДа, разработанный на основе аналогичных природных белков вартонова студня пупочного канатика.

Наносекундная лазерная микрохирургия клеточных сфероидов

Облучение сфероидов проводили на установке Palm CombiSystem (Zeiss, Германия) с помощью наносекундного лазерного скальпеля (длина волны 355 нм, частота импульсов 100 Гц, длительность импульсов 2 нс, максимальная энергия в импульсе 9 мкДж). Лазерное излучение фокусировали на образце с помощью микрообъектива Zeiss Fluor (10×, NA 0.5). Для работы с лазерным скальпелем использовали программное обеспечение PALM RoboPro.

Наносекундным лазерным скальпелем осуществляли повреждение поверхностных и внутренних слоев сфероида. Прямолинейную траекторию облучения сфероида лазерными импульсами от периферии к центру задавали вручную в интерфейсе программы. Заданная траектория отрабатывалась в течение 5–8 циклов, каждый раз положение максимальной фокусировки лазерного луча смещалось в аксиальном направлении (вдоль оси Z) от нижнего положения до верхнего так, чтобы последовательно от плоскости к плоскости осуществлялась диссекция объемного сфероида. В каждом агарозном планшете облучали 25–30 сфероидов. Процедура, как правило, занимала не более 30 мин. После облучения сфероида экспериментальных и контрольной групп возвращали в

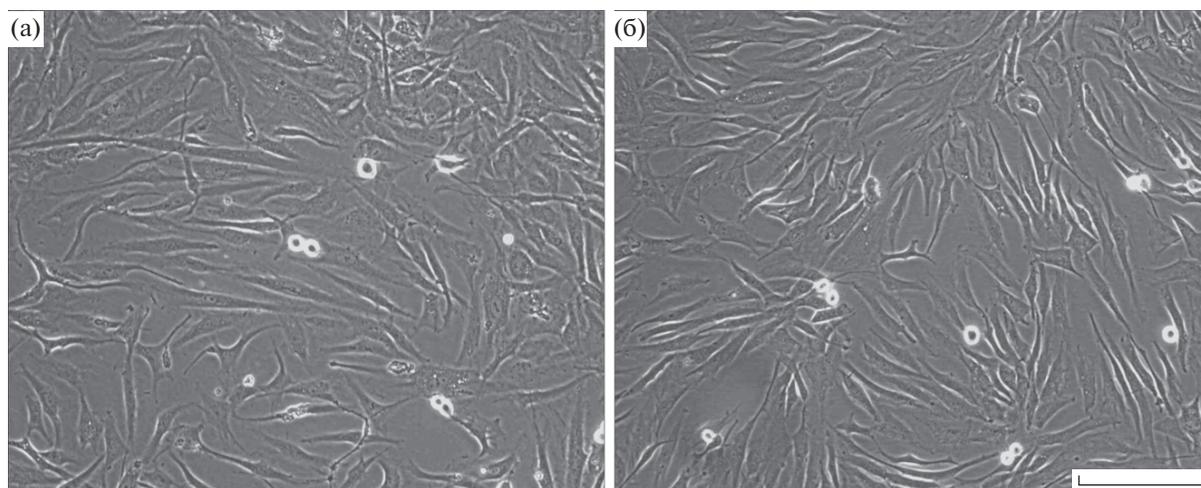


Рис. 1. Культура дермальных фибробластов кожи человека. а – первый пассаж, б – четвертый пассаж. Световая микроскопия, фазовый контраст, измерительный отрезок 50 мкм.

условия CO_2 -инкубатора (37°C , $5\% \text{CO}_2$) для дальнейшего наблюдения процессов репарации.

Лазерная микрохирургия сфероидов была выполнена с применением оборудования ЦКП “Лазерный Фемтосекундный Комплекс” ФГБУ науки Объединенный институт высоких температур РАН.

Цейтраферная (time-lapse) микроскопия

Первые 5 минут после лазерного воздействия цейтраферную (time-lapse) микроскопию с фоторегистрацией проводили на установке PALM CombiSystem (Zeiss, Германия), интервал между кадрами составлял 5 с. В течение 7 сут после лазерного воздействия проводили длительное прижизненное наблюдение в стандартных условиях (37°C , $5\% \text{CO}_2$) камеры прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия). Фоторегистрацию каждые 20 мин осуществляли с помощью программы Cell-IQ Imagen, обработку изображений проводили в программном пакете Cell-IQ Analyzer.

Семидневные сфероиды контрольной и экспериментальной групп через час после лазерной микродиссекции фиксировали для последующего гистологического анализа.

Гистологический анализ

Фиксацию сфероидов осуществляли в глутаровом альдегиде (1.5% раствор на 0.1 М какодилатном буфере, $\text{pH} = 7.3$, 1–2 ч), дофиксировали OsO_4 (1% водный раствор, 1–2 ч), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации 50° , 70° , 96° (2 смены по 5 мин в каждой), ацетоне (3 смены по 10 мин) и заключали в смесь эпоксидных смол Araldite M и Araldite Hardener (Sigma, США), с добавлением катализатора DMP30 (Химмед, Москва), и пла-

стификатора дибутилфталата (Химмед, Москва). Для полимеризации смолы образцы инкубировали при 60°C в течение 3–5 сут.

Полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC6 (Австрия), окрашивали 2–3 минуты метиленовым зеленым (Sigma, США). Препараты просматривали в видимом световом диапазоне, на микроскопе Olympus BX51 (Olympus, Япония), снабженном фотокамерой Color View II, для фоторегистрации использовали программу Cell F.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фибробласты, выделенные из полученных образцов кожи человека, обладали хорошими культуральными характеристиками, имели достаточно высокую пролиферативную активность. Первичная культура на 1 пассаже представляла собой гетерогенную популяцию из клеток различных форм и размеров. При изучении под микроскопом клетки в фазе активного роста имели в среднем размер 180×12 мкм. Через 2–3 сут клетки формировали равномерный плотный монослой (рис. 1а). При пассировании культура становилась гомогенной – клетки приобретали веретеновидную форму и размеры, в среднем, 100×10 мкм. Цитоплазма имела характерную мелкую зернистость, ядра были ориентированы по длинной оси клеток, содержали по 1–3 ядрышка. Наблюдали характерный поточный рост клеток, расположение параллельными группами, ориентированными в различных направлениях. При дальнейшем культивировании клетки сохраняли высокий индекс пролиферации, значения превышали 2.5 (таблица). Морфология полученных культур клеток дермы кожи человека характеризовалась типичной для фибробластов картиной роста и была представлена

Индекс пролиферации культур фибробластов дермы кожи человека

Биоптат дермы	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж
1, взрослый донор 54 года	2.71 ± 0.15	3.20 ± 0.25	2.67 ± 0.24
2, взрослый донор 52 года	2.73 ± 0.27	2.67 ± 0.18	2.55 ± 0.25

поточно-расположенными клетками (рис. 1). Фибробласты на 4 пассаже активно экспрессировали характерные маркеры (цитокератин 19, эластин, фибронектин, коллагены I, III и IV типов), отвечающие за основные биомеханические свойства кожи, такие как гладкость, упругость, эластичность (Кожина и др., 2015, 2016).

Технология 3D культивирования в агарозных планшетах позволила масштабировать процесс получения стандартных жизнеспособных сфероидов, каждый сфероид формировался в своей лунке из заданного количества клеток. За 7 сут дермальные фибробласты 4 пассажа успешно формировали жизнеспособные плотные сфероиды. Процесс компактизации сфероидов из дермальных фибробластов начинался уже в первые часы 3D культивирования и продолжался до 7 сут. В составе компактных сформированных семидневных сфероидов выделяли две области – 2–4 слоя поверхностных уплощенных клеток и полигональные клетки внутренней зоны. Черепицеобразно расположенные клетки поверхностной зоны плотно прилегали друг к другу, полигональные клетки внутренней зоны располагались рыхло во внеклеточном матриксе (рис. 3а). Средний диаметр сформированных сфероидов составлял 150 мкм, что обеспечивало нормальную диффузию питательных веществ во внутреннюю зону сфероидов.

В трехмерных условиях клетки сохраняют характерное для условий *in vivo*, важное для функционирования, ядерно-цитоплазматическое отношение, и соотношение объема цитоплазмы к площади мембраны (Baker, Chen, 2012). Поэтому клетки в сфероидовиде более стабильны, чем в регулярно пассируемых 2D монослойных культурах (Antoni et al., 2015). При формировании сфероидов клетки формируют межклеточные контакты и создают микроокружение, поддерживающее их нативный фенотип. Описанная структура сфероидов из фибробластов кожи человека соответствует известным данным о строении сфероидов из данного типа клеток (Кожина и др., 2015), а также из мезенхимных клеток различного происхождения (Сабурова и др., 2013; Кошелева и др., 2015).

Повреждение сфероидов фибробластов наносекундным лазерным скальпелем

Параметры лазерного излучения, в частности, энергия импульсов, были оптимизированы так, чтобы осуществлялась эффективная микродис-

секция заданной области поверхностной и внутренней зон сфероидов без смещений объекта в ходе воздействия. Энергию импульсов подбирали в зависимости от размеров сфероидов, неоднородности толщины агарозного планшета, в котором находились сфероиды, и ее значения варьировали в диапазоне 7–9 мкДж. Процесс лазерного воздействия и формирование кавитационного пузырька (рис. 2, стрелка), приводящие к видимым повреждениям сфероидов продемонстрированы на рис. 2. Лазерное воздействие на сфероиды длилось 5–30 с, в последующие 5 мин после воздействия лазерных импульсов наблюдали спонтанное раскрытие краев раны на угол более 180° (рис. 2).

В области повреждения с первых минут после воздействия лазерным диссектором (рис. 2) отмечали образование фрагментов погибших клеток. Увеличение угла раствора краев раны сопровождалось изменением морфологии клеток раневой поверхности, их форма менялась с вытянутой уплощенной на округлую. Структура поверхностного слоя в неповрежденной области практически не менялась, сохраняла целостность.

Результаты гистологического анализа подтвердили описанные изменения и показали, что уже в течение часа после микродиссекции раневая поверхность содержала округлые клетки и фрагменты погибших клеток (рис. 3б). В области повреждения нарушалась исходная структура сфероидов, морфология поверхностной и внутренней зон унифицировалась: клетки меняли форму на округлую. Непосредственно в области повреждения лишь одиночные клетки, окруженные клеточным дебрисом, сохраняли свою исходную морфологию. Вероятно, в поврежденной области активно проходили процессы фагоцитоза.

Основным “хирургическим” механизмом, вызывавшим диссекцию тканей при воздействии наносекундных лазерных импульсов, являлись образование плазмы и оптический пробой (Rau et al., 2006; Genc et al., 2014). При незначительном превышении энергии лазерных импульсов над пороговым значением, оптический пробой сопровождался образованием кавитационных пузырьков размером порядка нескольких микрометров. Этот процесс приводил к видимому повреждению облучаемой ткани, но за счет небольшого размера кавитационных пузырьков удавалось достичь локализованной микрохирургии выбранного объекта. Энергия наносекундных лазерных импульсов была нами тщатель-

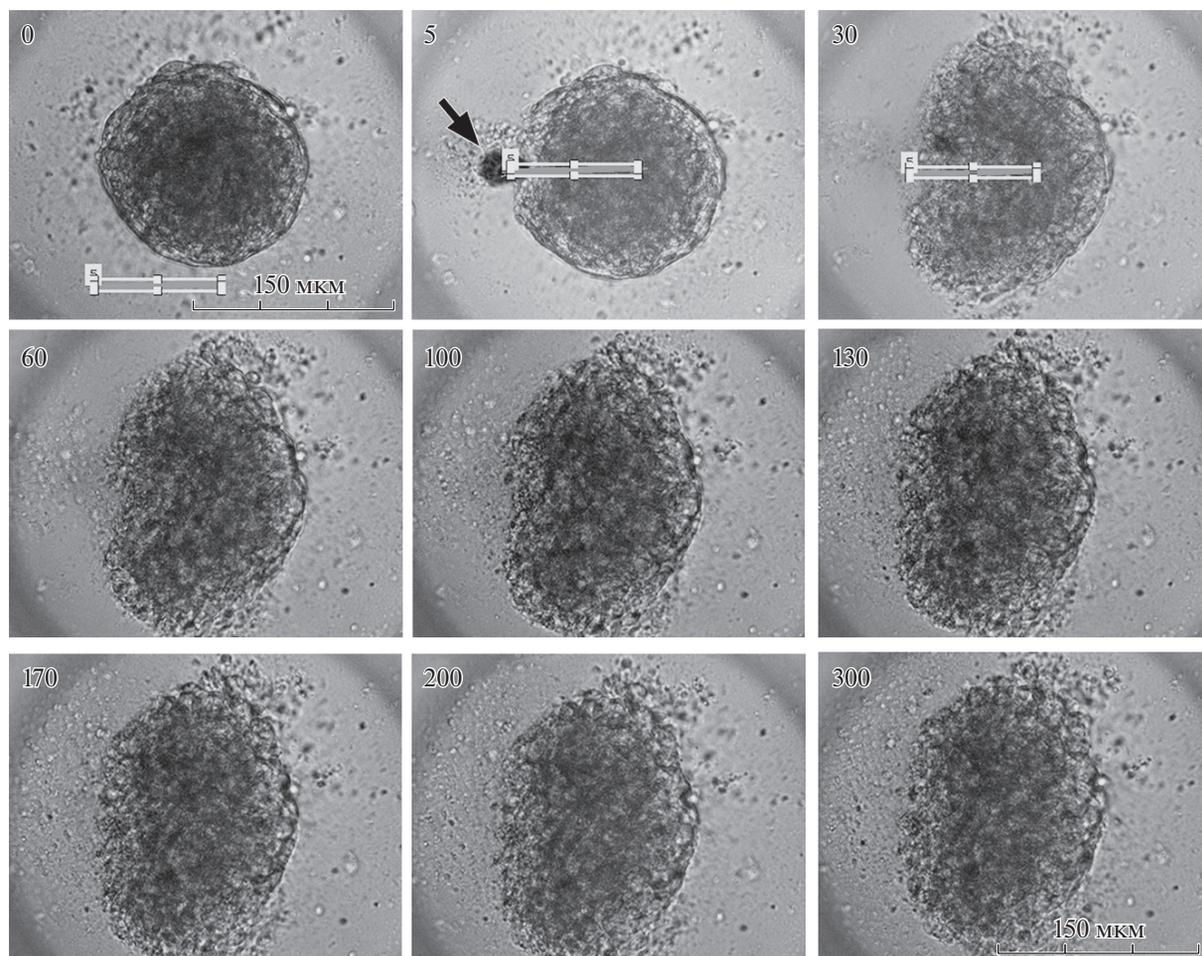


Рис. 2. Прижизненная цейтраферная съемка в течение первых 5 мин после нанесения повреждения наносекундным лазерным скальпелем 7-дневным сфероидом из фибробластов кожи человека. 0 с — общий вид сфероида до облучения. Красной линией показана выбранная траектория облучения; 5–30 с — повреждение лазерным скальпелем; 60–300 с — спонтанное раскрытие краев раны, увеличение угла раствора краев раневой поверхности после микродиссекции. Стрелкой указан кавитационный пузырьрек. Световая микроскопия, фазовый контраст, измерительный отрезок 150 мкм.

но оптимизирована, чтобы диссекция заданной области сфероидов осуществлялась эффективно, без нежелательного повреждения сфероида в целом.

Репарация сфероидов дермальных фибробластов после повреждения лазерным диссектором

Проведенное длительное прижизненное наблюдение экспериментальных сфероидов с использованием цейтраферной (time-lapse) микроскопии в течение 7 сут после лазерной микродиссекции позволило проанализировать динамику репарации после повреждения. Данные представлены на рис. 4. Через сутки после повреждающего воздействия структура сфероида частично восстанавливалась, клетки в поверхностных слоях начинали уплощаться, дебрис погибших поврежденных клеток постепенно исключался из состава сфероида.

Состав полной ростовой среды влиял на скорость репарации после микродиссекции. В среде без добавок за 7 сут не происходило восстановление сфероидов, сохранялся дебрис из погибших поврежденных клеток, структура поверхностного слоя была практически полностью нарушена по всему периметру сфероида. Добавление в среду синтетического пептида P199 ускоряло репарацию: уже к 3 сут практически полностью исключался дебрис погибших и поврежденных клеток, структура сфероида частично восстанавливалась, клетки в поверхностной зоне снова начинали приобретать уплощенную форму. Полное восстановление исходной структуры сфероидов с несколькими поверхностными слоями уплощенных черепицеобразно расположенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны происходило к 7 сут после микродиссекции (рис. 4д–4з). Кроме того, отмечено, что диаметр сфероида после репарации был меньше исходного значения.

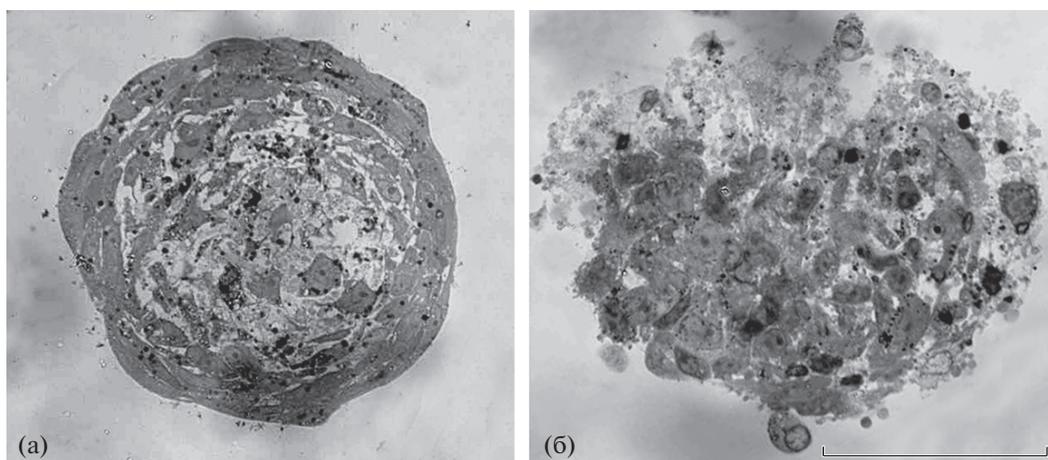


Рис. 3. Гистологический анализ структуры сфероидов из фибробластов кожи человека после воздействия наносекундным лазерным скальпелем. а – интактный контрольный сфероид; б – поврежденный сфероид через час после воздействия наносекундным лазерным скальпелем. Полутонкие срезы, окрашивание метиленовым зеленым, световая микроскопия, измерительный отрезок 50 мкм.

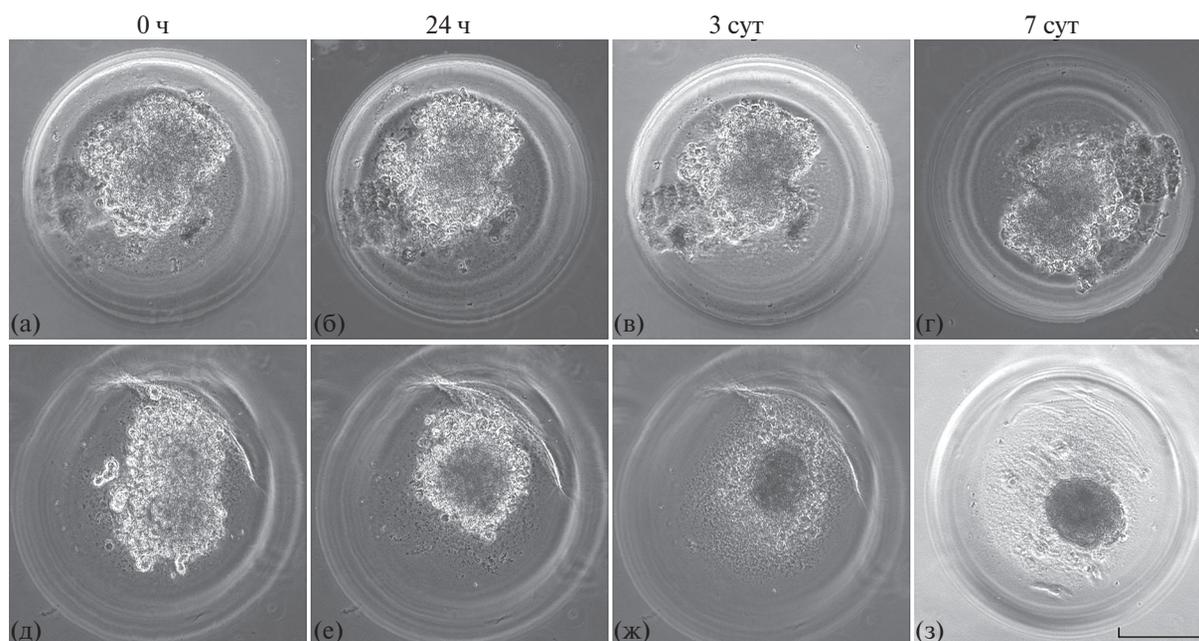


Рис. 4. Длительная прижизненная цейтраферная съемка в течение 7 сут после нанесения микродиссекции наносекундным лазерным скальпелем сфероидов из фибробластов 4 пассажа. 0, 24 ч, 3 и 7 сут после воздействия. а–г сфероиды после повреждения культивировали в среде без добавок, д–з сфероиды после повреждения культивировали в среде с добавлением олигопептида Р199. Световая микроскопия, фазовый контраст, измерительный отрезок 100 мкм.

Разработанная модель лазерной микродиссекции и оптимально подобранные условия лазерного воздействия позволили нам повредить поверхностную и внутреннюю зоны в заданной области сфероида без нарушения жизнеспособности объекта в целом. При выбранных режимах лазерного облучения в раневой области сфероида появлялось множество клеточных фрагментов, что связано непосредственно с физическим воздействи-

ем, при этом в неповрежденной области сфероида сохранялась исходная структура. Релаксация механических напряжений играет важную роль в эмбриогенезе, морфогенезе и дифференцировке (Belousov et al., 1999; Fouchard et al., 2014). За счет разной плотности упаковки клеток поверхностной и внутренней зон сфероидов при микродиссекции повреждались преимущественно клетки поверхностной зоны экспериментальных сферо-

идов. Подобное изменение могло способствовать релаксации механических напряжений и приводить к увеличению угла раствора краев раневой поверхности после микродиссекции, что способствовало очищению раны от погибших клеток и их фрагментов.

Мы наблюдали восстановление общей формы сфероидов уже в первые часы после повреждения, в то время как внутренняя структура сфероидов восстанавливалась постепенно, и репарационные процессы завершались за 7 сут только в присутствии синтетического пептида Р199.

Применяемые в косметологии синтетические пептиды, разработанные на основе природных аналогов, могут регулировать пролиферацию и миграцию клеток, воспаление, ангиогенез, меланогенез и синтез белков внеклеточного матрикса. Кроме того, синтетические пептиды в основном состоят из L-аминокислот, которые в общем случае не иммуногенны и легко утилизируются организмом (Zhang et al., 2009). В данном исследовании в качестве тестируемого препарата был выбран пептид Р199, аналогичный белкам вартонова студня, обладающим клинически доказанными в отношении кожи человека при старении и после ожогов стойкими антивозрастными, омолаживающими и регенерационными свойствами (Петриковский, 2012). Этот пептид стимулирует пролиферацию фибробластов и стволовых клеток кожи, увеличивает синтез цитокинов и компонентов внеклеточного матрикса клетками дермы кожи человека (Шехватова и др., 2013; Юцковская, Данилова, 2014). Для колониобразования в культуре фибробластов важен баланс стволовых хорошо пролиферирующих и нишеобразующих компонентов популяции (Егоров и др., 2007). Способность клеток формировать сфероиды является уникальной простой тестовой системой для определения клеточной зрелости и оценки влияния на нее исследуемых препаратов. Для сфероидообразования важен определенный уровень экспрессии фибронектина и интегринов $\alpha 5$ и $\beta 1$ фибробластами (Salmenperä et al., 2008). В культуре стареющих дермальных фибробластов 18 пассажа пептид Р199 восстанавливал способность формировать сфероиды за счет стимуляции синтеза в достаточном для установления межклеточных контактов количестве компонентов внеклеточного матрикса (эластин, коллаген IV типа, фибронектин) и восстановления мезенхимо-эпителиальной пластичности клеток (Кожина и др., 2016). Вероятно, в проведенном нами пилотном исследовании репарации сфероидов фибробластов после микродиссекции добавление пептида Р199 стимулировало восстановление структуры преимущественно за счет регуляции синтеза компонентов внеклеточного матрикса.

Важно отметить, что после микродиссекции диаметр репарировавшихся сфероидов уменьшался по сравнению с исходным, края раны не смыкались, дефект по-видимому заполняли неповрежденные клетки внутренней зоны. В связи с этим, можно предположить, что репарация сфероидов из дермальных фибробластов после лазерной микродиссекции происходила не за счет пролиферации, а за счет ремоделирования имеющихся жизнеспособных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репарация и восстановление тканей играют важную роль в нормальном функционировании организма. Изучение репарации *in vitro* на монослойных культурах клеток позволяет оценивать только пролиферацию и миграцию клеток в одной плоскости. Для детального понимания процессов регенерации необходимы модели, учитывающие сложные трехмерные взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом. Клеточные сфероиды можно считать аналогами бессосудистых тканей, они являются адекватной *in vitro* моделью для исследования заживления ран. Мы предложили и разработали новую простую воспроизводимую модель изучения механизма заживления раны в трехмерных условиях *in vitro* на клеточных сфероидеях с применением лазерной микродиссекции. Разработанная модель лазерной микродиссекции и оптимально подобранные условия лазерного воздействия позволили нам повредить поверхностную и внутреннюю зоны в заданной области сфероида без нарушения жизнеспособности объекта в целом. На предложенной модели получены первые данные стимуляции восстановления структуры сфероидов фибробластов синтетическим пептидом Р199, инициирующим антивозрастные и регенерационные эффекты в коже.

Модель повреждения сфероидов на основе лазерной микрохирургии открывает новые возможности для изучения механизмов регенерации и исследования роли формирующих сфероид клеток в репарации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С. и др. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 2. С. 105–119.
- Кожина К.В., Волкова Е.Н., Сабурина И.Н. и др. Изучение влияния пептидных биорегуляторов на возрастные изменения кожи в культуральной модели в 3D-формате // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2016. Т. 19. № 1. С. 58–63.
- Кожина К.В., Сабурина И.Н., Горкун А.А. и др. Сравнительный анализ воздействия р199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека // Патогенез. 2015. № 4. С. 34–40.

- Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н., Рыбаков А.С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине // Патогенез. 2014. Т. 11. № 2. С. 17–25.
- Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурин И.Н. и др. Влияние эмбриональной телячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза // Патогенез. 2015. Т. 13. № 2. С. 4–11.
- Петриковский Б. Клеточное обновление кожи как результат пептидной регуляции активности собственных стволовых клеток // Эстетическая медицина. 2012. № 2. С. 283–293.
- Сабурин И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М. и др. Изучение ангиогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // Патогенез. 2013. Т. 11. № 1. С. 65–68.
- Шехватова А.С., Дурнова А.О., Кветной И.М. и др. Экспрессия сигнальных молекул под действием пептида P199 в составе препарата Meso-Wharton // Инъекционные методы в косметологии. 2013. № 4. С. 38–46.
- Юцковская Я.А., Данилова А.А. Терапия кожи с признаками хронологического старения препаратом Meso-Wharton P199. Клинический пример // Пластическая хирургия и косметология. 2014. № 3. С. 337–496.
- Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. № 11. P. 873–884.
- Antoni D., Burcke H., Jossset E. et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo* // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. № 3. P. 5517–5527.
- Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues // J. Cell Sci. 2012. V. 125. № 13. P. 3015–3024.
- Belousov L.V., Ermakov A.S., Luchinskaia N.N. Cytomechanical control of morphogenesis // Tsitologiya. 1999. V. 42. № 1. P. 84–91.
- Bely A.E. Evolutionary loss of animal regeneration: pattern and process // Integr. Comp. Biol. 2010. V. 50. № 4. P. 515–527.
- Bruns T., Schickinger S., Wittig R. et al. Preparation strategy and illumination of three-dimensional cell cultures in light sheet-based fluorescence microscopy // J. Biomed. Opt. 2012. V. 17. P. 1015181–1015185.
- Clement-Sengewald A., Schütze K., Ashkin A. et al. Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers // J. Assist. Reprod. Genet. 1996. V. 13. P. 259–265.
- Colombelli J., Reynaud E.G., Rietdorf J. et al. *In vivo* selective cytoskeleton dynamics quantification in interphase cells induced by pulsed ultraviolet laser nanosurgery // Traffic. 2005. V. 6. P. 1093–1102.
- Fouchard J., Bimbard C., Bufi N. et al. Three-dimensional cell body shape dictates the onset of traction force generation and growth of focal adhesions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 36. P. 13075–13080.
- Genc S.L., Ma H., Venugopalan V. Low-density plasma formation in aqueous biological media using sub-nanosecond laser pulses // Appl. Phys. Lett. 2014. V. 105. № 6. P. 063701.
- Haycock J.W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques // Methods Mol. Biol. 2011. V. 695. P. 1–15.
- Heisterkamp A., Maxwell I.Z., Mazur E. et al. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses // Opt. Express. 2005. V. 13. № 10. P. 3690–3696.
- Ilina O., Bakker G.-J., Vasaturo A. et al. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion // Phys. Biol. 2011. V. 8. № 1. P. 015010.
- Ilina I.V., Ovchinnikov A.V., Chefonov O.V. et al. Noncontact microsurgery of cell membranes using femtosecond laser pulses for optoinjection of specified substances into cells // Quantum Electronics. 2013. V. 43. № 4. P. 365–369.
- Ilina I.V., Ovchinnikov A.V., Sitnikov D.S. et al. Noncontact microsurgery and delivery of substances into stem cells by means of femtosecond laser pulses // Quantum Electronics. 2014. V. 44. № 6. P. 594–598.
- Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A. et al. Application of femtosecond laser scalpel and optical tweezers for non-contact biopsy of late preimplantation embryos // High Temperature. 2015. V. 53. № 6. P. 804–809.
- Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A. et al. Femtosecond laser assisted hatching: dependence of zona pellucida drilling efficiency and embryo development on laser wavelength and pulse energy // High Temperature. 2016. V. 54. № 1. P. 46–51.
- Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing // Mech. Ageing Dev. 2002. V. 123. № 7. P. 801–810.
- Khodjakov A., La Terra S., Chang F. Laser microsurgery in fission yeast: role of the mitotic spindle midzone in anaphase B // Curr. Biol. 2004. V. 14. № 15. P. 1330–1340.
- König K., Uchugonova A., Gorjup E. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of 3D-stem cell spheroids during differentiation // Microsc. Res. Tech. 2011. V. 74. № 1. P. 9–17.
- Kosheleva N.V., Ilina, I.V., Zurina, I.M. et al. Laser-based technique for controlled damage of mesenchymal cell spheroids: a first step in studying reparation *in vitro* // Biol. Open. 2016. V. 5. № 7. P. 993–1000.
- Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V. et al. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows // J. Cytol. Histol. 2015. V. 6. № 6. P. 378.
- Lin R.-Z., Chang H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnol. J. 2008. V. 3. № 9–10. P. 1172–1184.
- Magidson V., Loncarek J., Hergert P. et al. Laser microsurgery in the GFP era: a cell biologist's perspective // Methods Cell Biol. 2007. V. 82. P. 239–266.
- Makrantonaki E., Zouboulis C.C. Molecular mechanisms of skin aging // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. V. 1119. № 1. P. 40–50.
- Pampaloni F., Ansari N., Stelzer E.H. High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy // Cell Tissue Res. 2013. V. 352. № 1. P. 161–177.
- Rattan S.I.S. Aging of skin cells in culture // Textbook of Aging Skin. Springer Berlin Heidelberg, 2010. P. 487–492.

- Rau K.R., Quinto-Su P.A., Hellman A.N. et al. Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic // *Biophys. J.* 2006. V. 91. № 1. P. 317–329.
- Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V. et al. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation *in vitro* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. V. 158. № 1. P. 137–144.
- Sacconi L., Tolic-Norrelykke I.M., Antolini R. et al. Combined intracellular three-dimensional imaging and selective nanosurgery by a nonlinear microscope // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. № 1. P. 014002–014025.
- Salmenperä P., Kankuri E., Bizik J. et al. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction // *Experimental Cell Research.* 2008. V. 314. № 19. P. 3444–3452.
- Shen N., Datta D., Schaffer C.B. et al. Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor // *Mech. Chem. Biosyst.* 2005. V. 2. № 1. P. 17–25.
- Stevenson D., Agate B., Tsampoula X. et al. Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency // *Opt. Express.* 2006. V. 14. № 16. P. 7125–7133.
- Uchugonova A., Riemann I., Stracke F. et al. The influence of NIR femtosecond laser radiation on the viability of 3D stem cell clusters and tumor spheroids // *Biomedical Optics (BiOS). International Society for Optics and Photonics.* 2007. P. 64421Z–64421Z–5.
- Uchugonova A., König K., Bueckle R. et al. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses // *Opt. Express.* 2008. V. 16. № 13. P. 9357–9364.
- Zhang L., Falla T.J. Cosmeceuticals and peptides // *Clin. Dermatol.* 2009. V. 27. № 5. P. 485–494.

Cellular Model Based on Laser Microsurgery of Cell Spheroids to Study the Repair Process

N. V. Kosheleva^{a, c, *}, I. V. Il'ina^b, K. V. Kozhina^a, I. M. Zurina^a, A. E. Roskova^c, A. A. Gorkun^a, A. V. Ovchinnikov^b, M. B. Agranat^b, S. G. Morozov^a, and I. N. Saburina^{a, d}

^aInstitute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

^bInstitute of High Temperatures Scientific Association (IVTAN), Russian Academy of Sciences, Moscow, 127412 Russia

^cMoscow State University for Geodesy and Cartography, Moscow, 119234 Russia

^dRussian Medical Academy of Postdiploma Education Ministry of Health, Moscow, 123995 Russia

*e-mail: n_kosheleva@mail.ru

Received August 29, 2016

In this study, modern techniques of laser microsurgery of cell spheroids have been used to develop a new simple, reproducible model for studying the mechanisms of repair and regeneration *in vitro*. Nanosecond laser pulses were applied to perform a microdissection of the outer and the inner zones of the spheroids of dermal fibroblasts. To achieve effective dissection and preservation of spheroid viability, the optimal parameters were chosen: 355 nm wavelength, 100 Hz frequency, 2 ns pulse duration, laser pulses in the range of 7–9 μJ. After microdissection, we observed injury of the spheroids and the edges of the wound surface opened and that the angular opening reached a value of more than 180°. As early as during the first hour after spheroid microdissection with laser radiation, the surviving cells changed their shape into a round one: cells on the spheroid surface and directly in the damaged area became rounded. One day after microdissection, the structure of the spheroids began to partially recover, the cells in the surface layers began to take the original flattened shape; debris of dead damaged cells and their fragments was gradually cleared from the spheroid composition. In the proposed model, the first data on stimulation of structure recovery of injured spheroids of dermal fibroblasts with a P199 synthetic polypeptide, which is used in cosmetology for the initiation of antiaging and regenerative effects in the skin, were received. After microdissection, recovery of the spheroids structure of fibroblasts with a few surface layers of flattened imbricated arranged cells and polygonal cells of the inner zone in the presence of P199 peptide was faster than in the control group, and was completed within 7 days, presumably due to the remodeling of the survived cells.

Keywords: laser microsurgery, fibroblast spheroids, nanosecond laser scalp, repair of cell spheroids