

УДК 576.54

Создание модели репарации клеточных сфероидов на основе микрохирургии наносекундным лазерным скальпелем

Кошелева Н.В.^{1,3}, Ильина И.В.², Зурина И.М.¹, Роскова А.Е.³, Горкун А.А.¹, Овчинников А.В.², Агранат М.Б.², Сабурова И.Н.^{1,4}

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», РФ, 125315, Москва, Балтийская ул., д.8

² — ФГБУ науки Объединенный институт высоких температур РАН, РФ, 125412, Москва, Ижорская ул., д.13, стр.2

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, РФ, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

⁴ — ГБОУДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, РФ, 123995, Москва, Баррикадная ул, д.2/1, стр.1. e-mail: n_kosheleva@mail.ru

Для корреспонденции: Кошелева Анастасия Владимировна, n_kosheleva@mail.ru

Современные методы лазерной микрохирургии клеточных сфероидов были использованы для разработки новой простой воспроизводимой модели для изучения механизмов репарации и регенерации *in vitro*. С помощью излучения наносекундного лазера (длина волны 355 нм, частота 100 Гц, длительность импульсов 2 нс) проводили микродиссекцию поверхностной и внутренней зон сфероидов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ). Для сохранения жизнеспособности сфероида при эффективной диссекции энергию лазерных импульсов регулировали в диапазоне 7–9 мкДж. После микродиссекции края раневой поверхности расходились на угол более 180°, нарушалась структура сфероида. За короткий промежуток времени (2–3 часа) изменялась форма выживших после повреждения клеток. Находящиеся на поверхности сфероида и непосредственно в области повреждения клетки становились округлыми. Полное восстановление структуры сфероидов происходило в течение 7 суток за счет ре-моделирования выживших клеток.

Ключевые слова: лазерная микрохирургия, сфероиды ММСК, наносекундный лазерный скальпель

Введение

Процессы регенерации, восстанавливающие утраченные части организма, могут протекать после повреждения на разных уровнях организации — клеточном, тканевом, органном, структурном или организменном. Регенерация может идти за счёт перестроения оставшейся после повреждения ткани без клеточной пролиферации (морфаллаксис) или за счёт пролиферации пула стволовых, а также транс- и дедифференцированных клеток (эпиморфоз), или при комбинации этих двух процессов [4]. При консервативности общих механизмов регенерации в эволюционном ряду падает, у млекопитающих практически утрачивается способность полноценно восстанавливать обширные участки организма после повреждения [8].

В современной биологии для моделирования и изучения процессов репарации и регенерации исследователи активно переходят из 2D в 3D условия [19]. Поведение, пролиферативная активность и физиологические свойства клеток в трехмерных системах *in vitro*, в отличие от 2D монослоя, приближены к условиям *in vivo* [14]. В 3D культурах клетки растут, взаимодействуя с окружением (клетками, внеклеточным матриксом, внешней средой) во всех трех измерениях [5, 32]. В настоящее время 3D культуры используют в области вспомогательных репродуктивных технологий [15], а также широко применяют для анализа пролиферации, жизнеспособности, морфологии и дифференцировки клеток в ответ на разнообразные стимулы, изучения межклеточных взаимодействий, миграции и инвазии опухолевых клеток в окружающие ткани [29, 33].

Одним из распространенных вариантов в исследованиях *ex vivo* трехмерных клеточных культур являются клеточные сфероиды. Они представляют собой трехмерные

самоорганизующиеся в силу природных адгезивных свойств сферические кластеры клеток. При получении сфероидов из суспензии одиночных клеток формируются не только межклеточные контакты, но и контакты с вновь синтезированным внеклеточным матриксом, в результате чего образуется структура, организация которой приближена к организации тканей *in vivo* [30]. Многие типы клеток имеют естественную тенденцию к агрегации, известны общие закономерности формирования сфероидов из клеток эпителиального и мезенхимного фенотипов [35].

Области применения клеточных сфероидов постоянно расширяются. Одной из актуальных задач в настоящее время является изучение механизмов заживления ран. Использование в качестве модельного объекта *in vitro* многослойных культур позволяет изучать лишь отдельные параметры поведения клеток (скорость миграции и пролиферации, синтез внеклеточного матрикса), но не позволяет оценивать вклад межклеточных взаимодействий и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, в связи с чем подобные исследования проводят в основном на животных *in vivo* или на органотипических культурах эксплантатов *ex vivo* [5, 18]. Тем не менее, поиски доступной воспроизводимой модельной системы для исследования механизмов регенерации продолжают. 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 медицине и биологии наибольшее распространение получили лазерные микродиссекторы на основе импульсных лазеров [31]. С их помощью становится возможной микрохирургия не только на тканевом, но и

на клеточном и даже субклеточном уровнях. Источники лазерного излучения фемтосекундной длительности рассматриваются в качестве наиболее перспективных. Они обеспечивают высокое пространственное и временное разрешение и характеризуются большей глубиной проникновения, что является чрезвычайно важным, в частности, при необходимости воздействия на внутритканевые структуры. С помощью фемтосекундных лазерных систем, обеспечивающих высокое пространственное и временное разрешение при большой глубине проникновения, были продемонстрированы возможности успешной диссекции ядер и инактивации органелл [20, 37], а также отделения от группы единичных живых клеток [27]. Данные системы также позволяют решать задачи избирательной доставки внеклеточных веществ в клетки — оптоинъекция и трансфекция [7, 21, 22, 38, 39]. Следует также отметить, что в последнее время продемонстрированы возможности успешной микрохирургии внутриклеточных структур с помощью наносекундных [26, 31] и пикосекундных лазерных систем [9, 13] с точностью сравнимой с фемтосекундными системами [36].

Помимо двумерных структур — монослоев клеток, методы лазерной микрохирургии были опробованы и на трехмерных объектах — эмбрионах различных организмов. Так, наносекундный лазерный диссектор применялся для формирования отверстия в оболочке ооцита при проведении искусственного оплодотворения или биопсии полярного тельца [12]. Также для задач вспомогательного хэтчинга и диссекции клеток трофэктодермы при биопсии на поздних сроках преимплантационного развития был успешно использован лазерный диссектор на основе фемтосекундного лазера [23, 24]. 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 лазерной микрохирургии на основе сфероидов.

Тем не менее, несмотря на интерес ученых к сфероидам и широкому распространению лазерных методов исследования в биологии и медицине, в настоящее время существует лишь несколько работ, в которых для изучения сфероидов применяли лазерные технологии. Эти работы посвящены методикам визуализации сфероидов и их дифференцировке [10, 25, 28, 32]. По данным авторов, есть единственная работа [40], в которой лазерный источник излучения применяли непосредственно для воздействия и локального повреждения сфероидов. Авторы продемонстрировали возможность необратимого оптического повреждения единичных клеток, выселившихся из сфероидов при сохранении жизнеспособности окружающих необлученных клеток. В свою очередь, изучение особенностей репарации сформированных сфероидов при более масштабных, «неточечных» повреждениях не было проведено на настоящий момент.

Таким образом, целью настоящего исследования стало создание доступной и воспроизводимой модели повреждения клеточных сфероидов с применением методов лазерной микрохирургии. Исследование было проведено на сфероидах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) человека. Для моделирования повреждений сфероидов было решено использовать наносекундный лазерный диссектор. Энергия ла-

зерных импульсов была оптимизирована таким образом, чтобы диссекция осуществлялась только в заданной области сфероида и не приводила к нарушению жизнеспособности сфероида, в целом.

Материалы и методы

Монослойная 2D культура клеток

В эксперименте использовали первичные культуры ММСК КМ человека (1.5.11, БиолоТ, Санкт-Петербург). 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), инсулина-трансферрина-селенита (1:100, БиолоТ), 20 нг/мл bFGF (ProSpec, Израиль) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Смену полной ростовой среды осуществляли 2—3 раза в неделю. Фенотип клеток и степень конfluenceности контролировали с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), в видимом световом диапазоне; фоторегистрацию осуществляли цифровой камерой DeltaPixViewer (Olympus, Япония). При достижении культурой конfluenceности 70%, клетки пассировали.

3D культивирование, получение клеточных сфероидов

Из охарактеризованных монослойных 2D культур 5-го пассажа получали 3D культуры ММСК КМ — 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.

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 9мкДж). Лазерное излучение фокусировали на образце с помощью микрообъектива ZeissFluar (10x, NA 0.5) Для работы с лазерным скальпелем использовали программное обеспечение PALMRoboPro.

Наносекундным лазерным скальпелем осуществляли повреждение поверхностных и внутренних слоев сфероида. Прямолинейную траекторию облучения сфероида лазерными импульсами от периферии к центру задавали вращением в интерфейсе программы. Заданная траектория последовательно обрабатывалась в течение 5—8 циклов, каждый раз положение максимальной фокусировки лазерного луча смещалось в аксиальном направлении (вдоль оси Z) от нижнего положения до верхнего таким образом, чтобы последовательно от плоскости к плоскости осуществлялась диссекция объемного объекта — сфероида. В каждом агарозном планшете облучали 25—30 сфероидов. Процедура, как правило, занимала не более 30 минут. После облучения сфероиды экспериментальной и контрольной групп возвращали в условия CO₂-инкубатора (+37°C, 5%CO₂) 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 60 минут после лазерного воздействия цейтраферную (time-lapse) микроскопию с фоторегистацией проводили на установке PALMCombiSystem (Zeiss, Германия), интервал между кадрами составлял 5 секунд в первые 5 минут после облучения. В течение 7 суток после лазерного воздействия проводили длительное прижизненное наблюдение в стандартных условиях (+37°C, 5% CO₂) камеры прибора Cell-IQ (SMTechnologies, Финляндия). Фоторегистрацию каждые 20мин осуществляли с помощью программы Cell-IQImagen, обработку изображений проводили в программном пакете Cell-IQAnalyzer. Семидневные сфероиды контрольной и экспериментальной групп через 2 часа после лазерной микродиссекции фиксировали для последующего гистологического анализа.

Гистологический анализ

Фиксацию сфероидов осуществляли в глютаровом альдегиде (1,5% раствор на 0,1М какодильном буфере, pH = 7,3, 1—2 часа), дофиксировали OsO₄ (1% водный раствор, 1—2 часа), 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 AralditeHardener (Sigma, США), с добавлением катализатора DMP30 (Химмед, Москва), и пластификатора дибутилфталата (Химмед, Москва). Для полимеризации смолы образцы инкубировали при +60°C в течение 3—5 суток.

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 ColorView II, для фоторегистрации использовали программу Cell F.

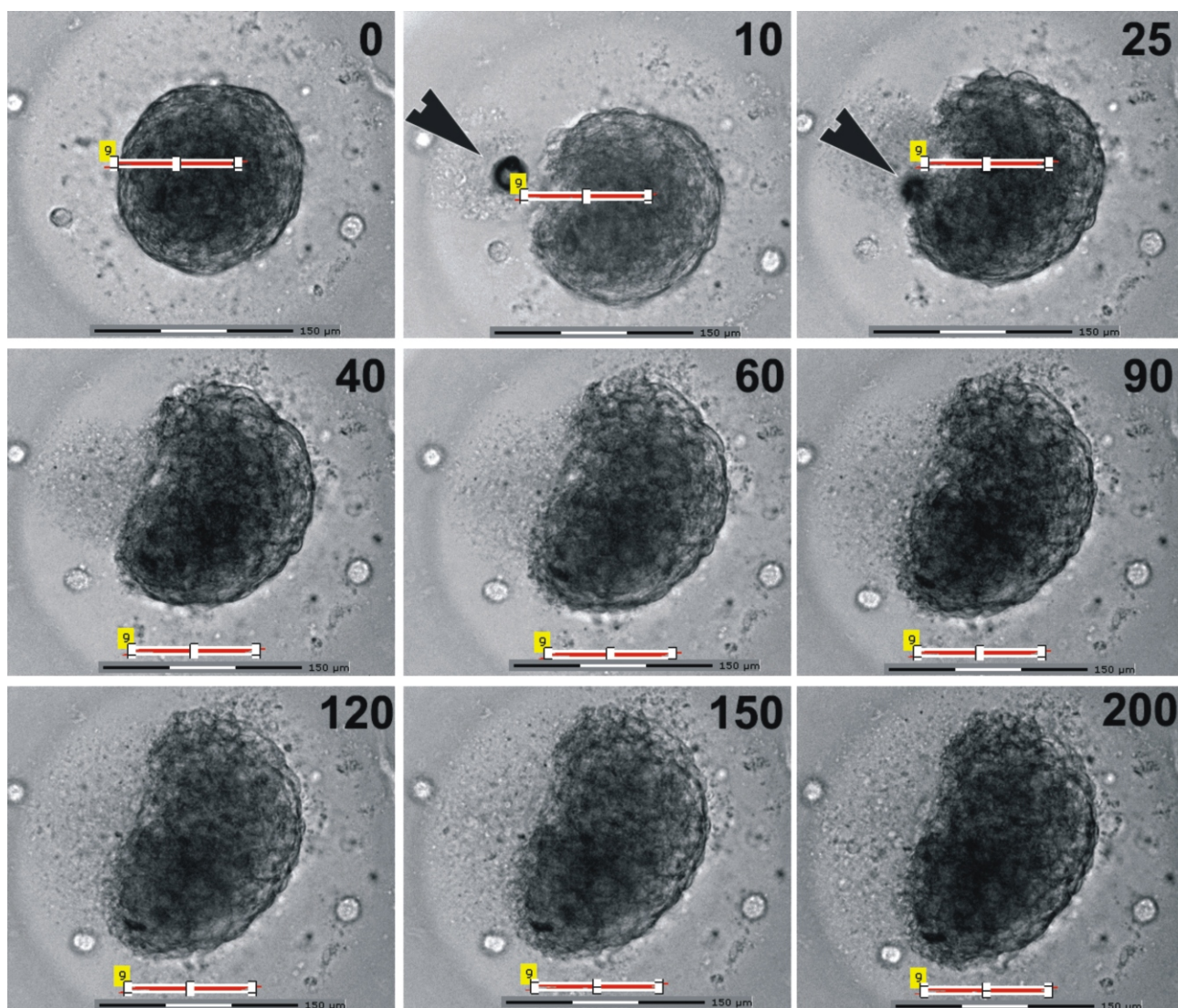


Рис. 1. Прижизненная цейтраферная съемка в течение первых 200 секунд после нанесения повреждения наносекундным лазерным скальпелем сфероидам ММСК КМ.

0 с — общий вид сфероида до облучения. Красной линией показана выбранная траектория облучения; 10—25 с — повреждение лазерным скальпелем; 40—200 с — спонтанное раскрытие краев раны, увеличение угла раствора краев раневой поверхности после микродиссекции. Стрелками указан кавитационный пузырек. Световая микроскопия, фазовый контраст, измерительный отрезок 150 мкм

Результаты и обсуждение

Клетки ММСК КМ в условиях 2D культивирования успешно формировали монослой, сохраняли высокий пролиферативный потенциал до 5 пассажа, имели характерную веретеновидную форму.

За 7 суток ММСК КМ пятого пассажа успешно формировали жизнеспособные плотные сфероиды. 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. 2А).

Повреждение сфероидов ММСК КМ наносекундным лазерным скальпелем

Параметры лазерного излучения, в частности, энергия импульсов, были оптимизированы так, чтобы осуществлялась эффективная микродиссекция заданной области поверхностной и внутренней зон сфероида без смещений объекта в ходе воздействия. Энергию импульсов подбирали в зависимости от размеров сфероида, неоднородности толщины агарозного планшета, в котором находились сфероиды, и её значения варьировали в диапазоне 7–9 мкДж. Процесс лазерного воздействия и формирование кавитационных пузырьков (рис. 1, стрелки), приводящих к видимым повреждениям сфероидов продемонстрирован на рис. 1. Лазерное воздействие на сфероиды длилось 10–30 секунд, в последующие 3 минуты после воздействия лазерных импульсов наблюдали спонтанное раскрытие краев раны (рис. 1).

В области повреждения с первых минут после воздействия лазером (рис. 1) 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, клетки оставались уплощенными.

Результаты гистологического анализа подтвердили описанные изменения и показали, что уже в течение первых двух часов после микродиссекции раневая поверхность содержала округлые клетки и фрагменты погибших клеток (рис. 2Б). В области повреждения нарушалась исходная структура сфероида, морфология поверхностной и внутренней зон унифицировалась: клетки меняли форму на округлую. В неповрежденной части сфероидов структура с разграничением поверхностной зоны уплощенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны сохранялась (рис. 2Б). Непосредственно в области повреждения лишь одиночные клетки, окруженные клеточным дебрисом, сохраняли свою исходную морфологию. Вероятно, в поврежденной области активно проходили процессы фагоцитоза.

Репарация сфероидов ММСК КМ после повреждения наносекундным лазерным скальпелем

Проведенное длительное прижизненное наблюдение экспериментальных сфероидов с использованием цейтраферной (time-lapse) микроскопии в течение 7 суток после лазерной микродиссекции позволило проанализировать динамику репарации после микродиссекции. Данные представлены на рис. 3. Восстановление структуры сфероида начиналось через 6 часов, дебрис погибших поврежденных клеток постепенно исключался из сфероида. Через сутки после повреждающего воздействия структура сфероида частично восстанавливалась, клетки в поверхностных слоях начинали уплощаться. Полное восстановление исходной структуры сфероидов с несколькими поверхностными слоями уплощенных черепицеобразно расположенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны происходило через 7 суток после микродиссекции. Кроме того, отмечено, что диаметр сфероида после репарации был меньше исходного значения.

В трехмерных условиях клетки сохраняют характерное для условий *in vivo*, важное для функционирования, ядерно-цитоплазматическое отношение, и соотношение объема цитоплазмы к площади мембраны [6]. Это делает клетки в сфероидах более стабильными, чем в регулярно пас-

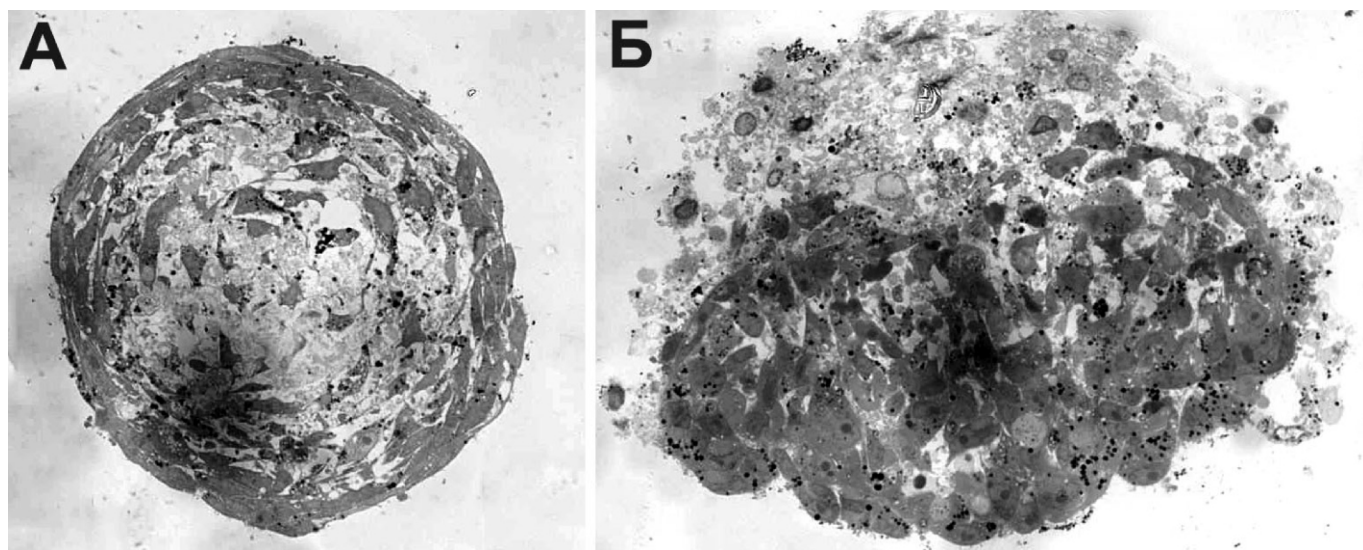


Рис. 2. Гистологический анализ структуры сфероидов из ММСК КМ после воздействия наносекундным лазерным скальпелем: А — интактный контрольный сфероид; Б — поврежденный сфероид через два часа после воздействия наносекундным лазерным скальпелем. Полутонкие срезы, окрашивание метиленовым зеленым, световая микроскопия

сируемых 2D монослойных культурах [5]. В полученных нами сформированных 7-суточных сфероидов ММСК КМ диаметром 150–200 мкм отчетливо выделяли 2–4 слоя плотных поверхностных уплощенных клеток и рыхлую внутреннюю зону полигональных клеток с внеклеточным матриксом. Подтверждением полученных данных служат результаты по получению сфероидов и подбору условий самосборки различных типов клеток в 3D системе под действием гравитационных сил [1, 2, 3, 11, 16, 35, 42].

Основным «хирургическим» механизмом, вызывавшим диссекцию тканей при воздействии наносекундных лазерных импульсов, являлись образование плазмы и оптический пробой [17, 34, 41]. При незначительном превышении энергии лазерных импульсов над пороговым значением, оптический пробой сопровождался образованием кавитационных пузырьков размером порядка нескольких микрон. Их возникновение приводило к видимому повреждению облучаемой ткани, но за счет небольшого размера кавитационных пузырьков удавалось достичь локализованной микрохирургии выбранного объекта. Таким образом, энергия наносекундных лазерных импульсов была нами тщательно оптимизирована, чтобы диссекция заданной области сфероидов осуществлялась эффективно, без нежелательного повреждения сфероида в целом.

Репарация и восстановление тканей играют важную роль в нормальном функционировании организма. Механизмы репарации и проблемы её нарушения до конца не изучены. Разработка модели повреждения сфероидов с применением лазерной микродиссекцией открывает возможности для изучения механизмов регенерации и исследования роли образующих сфероид клеток в репарации.

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 воздействием, при этом в неповрежденной области сфероида сохранялась исходная структура. За счет разной плотности упаковки клеток поверхностной и внутренней зон сфероидов при микродиссекции повреждались преимущественно и в большем количестве черепицеобразно расположенные клетки поверхностной зоны экспериментальных сфероидов. Подобное изменение могло способствовать релаксации механических напряжений и приводить к увеличению угла раствора краев раневой поверхности после лазерного воздействия, что могло способствовать быстрому очищению раны от погибших клеток и их фрагментов.

Мы наблюдали восстановление сферической формы уже в первые часы после повреждения. Внутренняя структура сфероидов восстанавливалась постепенно, и за 7 суток завершались репарационные процессы. Важно отметить, что после микродиссекции диаметр репарировавшихся сфероидов уменьшался по сравнению с исходным, края раны не смыкались, дефект, похоже, заполняли неповрежденные клетки внутренней зоны. В связи с этим, можно предположить, что репарация сфероидов ММСК КМ после лазерной микродиссекции происходила не за счет пролиферации, как при эпиморфной регенерации, а за счет ремоделирования имеющихся жизнеспособных клеток.

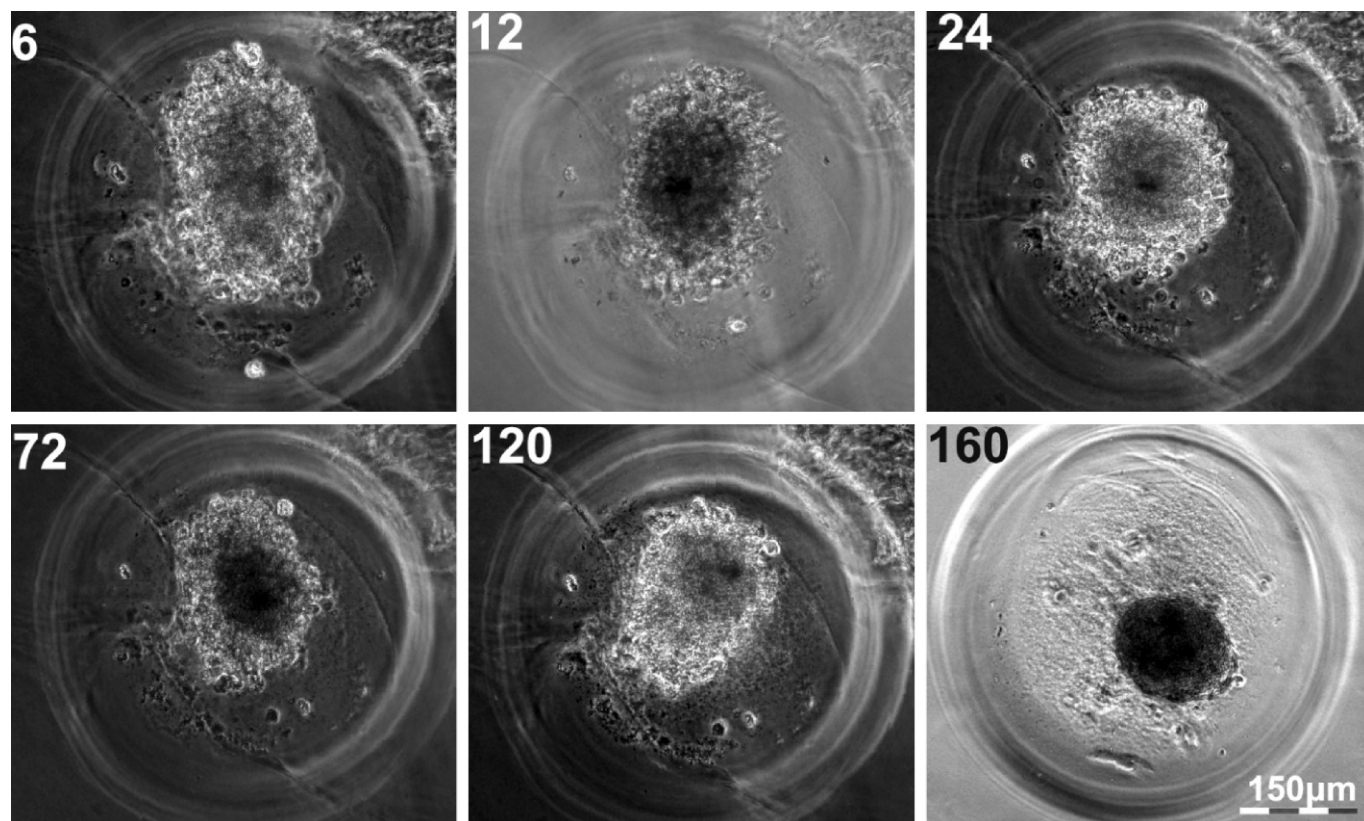


Рис. 3. Длительная прижизненная цейтраферная съемка в течение 7 суток после нанесения микродиссекции наносекундным лазерным скальпелем сфероидов из ММСК КМ. 6, 12, 24, 72, 120 и 160 часов после воздействия. Масштабный отрезок 150 мкм. Световая микроскопия, фазовый контраст.

Заключение

Изучение репарации *in vitro* на монослойных культурах клеток позволяет оценивать только пролиферацию и миграцию клеток и лишь в одной плоскости. Для детального понимания процессов регенерации необходимы модели, учитывающие сложные трехмерные взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом. Такими моделями являются трудоемкие, затратные и не всегда воспроизводимые эксперименты *in vivo* на животных. Мы предложили и разработали новую простую воспроизводимую модель изучения механизма репарации *in vitro* на клеточных сфероидах. Возможности комбинировать в сфероиде клетки разного фенотипа, происхождения в сочетании с инновационной технологией лазерной микродиссекции открывают широкие возможности для поиска и изучения новых путей стимуляции репарации и регенерации.

Список литературы

1. Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Сабурова И.Н. Изучение формирования мезенсфероидов из соматических клеток человека. *Онтогенез*. 2013; 44(4): 226-7.
2. Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурова И.Н., Горкун А.А., Колокольцова Т.Д., Борзенко С.А., Репин В.С. Влияние эмбриональной телячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза. *Патогенез*. 2015; 13(2): 4-11.
3. Сабурова И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Репин В.С. Изучение ангиогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. *Патогенез*. 2013; 11(1): 65-8.
4. Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the generation gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7(11): 873-84.
5. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(3): 5517-27.
6. Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012; 125(13): 3015-24.
7. Baumgart J., Bintig W., Ngezahayo A., Willenbrock S., Escobar H.M., Ertmer W., Lubatschowski H., Heisterkamp A. Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells. *Optics Express*. 2008; 16(5): 3021-31.
8. Bely A.E. Evolutionary loss of animal regeneration: pattern and process. *Integrative and comparative biology*. 2010; 50(4): 515-27.
9. Botvinick E.L., Venugopalan V., Shah J.V., Liaw L.H., Berns M.W. Controlled ablation of microtubules using a picosecond laser. *Biophys Journal*. 2004; 87: 4203-12.
10. Bruns T., Schickinger S., Wittig R., Schneckenburger H. Preparation strategy and illumination of three-dimensional cell cultures in light sheet-based fluorescence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2012; 17: 1015181-1015185.
11. Cesarz Z., Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. 2016; — doi:10.1155/2016/9176357
12. Clement-Sengewald A., Schutze K., Ashkin A., Palma G.A., Kerlen G., Brem G. Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1996; 13: 259-265.
13. Colombelli J., Reynaud E.G., Rietdorf J., Pepperkork R., Stelzer E.H. In vivo selective cytoskeleton dynamics quantification in interphase cells induced by pulsed ultraviolet laser nanosurgery. *Traffic*. 2005; 6: 1093-1102.
14. Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001; 294: 1708-1712.
15. Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art. *Acta Naturae*. 2015; 7(2): 48-56.
16. Frith J.E., Thomson B., Genvier P.G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010; 16(4): 735-749.
17. Genc S.L., Ma H., Venugopalan V. Low-density plasma formation in aqueous biological media using sub-nanosecond laser pulses. *Applied Physics Letters*. 2014; 105: 063701.
18. Gotttrup F., Agren M.S., Karlsmark, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*. 2000; 8(2): 83-96.
19. Haycock J.W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. *Methods Mol. Biol.* 2011; 695: 1-15.
20. Heisterkamp A., Maxwell I.Z., Mazur E., Underwood J.M., Nickerson J.A., Kumar S., Ingber D.E. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Optics Express*. 2005; 13: 3690-96.
21. Il'ina I.V., Ovchinnikov A.V., Chefonov O.V., Sitnikov D.S., Agranat M.B., Mikaelyan A.S. Noncontact microsurgery of cell membranes using femtosecond laser pulses for optoinjection of specified substances into cells. *Quantum Electronics*. 2013; 43: 365-69.
22. Il'ina I.V., Ovchinnikov A.V., Sitnikov D.S., Chefonov O.V., Agranat M.B. Noncontact microsurgery and delivery of substances into stem cells by means of femtosecond laser pulses. *Quantum Electronics*. 2014; 44: 594-8.
23. Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. Application of Femtosecond Laser Scalpel and Optical Tweezers for Noncontact Biopsy of Late Preimplantation Embryos. *High Temperature*. 2015; 53: 804-9.
24. Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. Femtosecond Laser Assisted Hatching: Dependence of Zona Pellucida Drilling Efficiency and Embryo Development on Laser Wavelength and Pulse Energy. *High Temperature*. 2016; 54: 46-51.
25. Ilina O., Bakker G.-J., Vasaturo A., Hoffman R.M., Friedl P. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. *Physical Biology*. 2011; 8(1): 015010.
26. Khodjakov A., La Terra S., Chang F. Laser Microsurgery in Fission Yeast: Role of the Mitotic Spindle Midzone in Anaphase B. *Current Biology*. 2004; 14: 1330-40.
27. Kohli V., Elezzabi A.Y., Acker J.P. Cell Nanosurgery Using Ultrashort (Femtosecond) Laser Pulses: Applications to Membrane Surgery and Cell Isolation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005; 37: 227-30.
28. Konig K., Uchugonova A., Gorjup E. Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of 3D-Stem Cell Spheroids During Differentiation. *Microscopy Research and Technique*. 2011; 74: 9-17.
29. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows. *Journal of Cytology & Histology*. 2015; 6(6): 378.
30. Lin R.-Z., Chang H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. 2008; 3: 1172-84.
31. Magidov V., Loncarek J., Hergert P., Rieder C.L., Khodjakov A. Laser microsurgery in the GFP era: a cell biologist's perspective. *Methods in Cell Biology*. 2007; 82: 237-66.
32. Pampaloni F., Ansari N., Stelzer E.H.K. High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy. *Cell and Tissue Research*. 2013; 352(1): 161-77.
33. Pampaloni F., Reynaud E.G., Stelzer E.H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8(10): 839-45.
34. Rau K.R., Quinto-Su P.A., Hellman A.N., Venugopalan V. Pulsed Laser Microbeam-Induced Cell Lysis: Time-Resolved Imaging and Analysis of Hydrodynamic. *Effects. Biophys. J.* 2006; 91(1): 317-29.
35. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 158(1): 137-44.
36. Sacconi L., Tolic-Norrelykke I.M., Antolini R., Pavone F.S. Combined intracellular three-dimensional imaging and selective nanosurgery by a nonlinear microscope. *Journal of Biomedical Optics*. 2005; 10: 014002-014025.
37. Shen N., Datta D., Schaffer C.B., LeDuc P., Ingber D.E., Mazur E. Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor. *Mech. Chem. Biosyst.* 2005; 2(1): 17-25.

38. Stevenson D., Agate B., Tsampoula X., Fischer P., Brown C.T.A., Sibbett W., Riches A., Gunn-Moore F., Dholakia K. Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency. *Optics Express*. 2006; 14(16): 7125-33.

39. Uchugonova A., Konig K., Bueckle R., Isemann A., Tempea G. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses. *Optics Express*. 2008; 16(0): 9357-64.

40. Uchugonova A., Riemann I., Stracke F., Gorjup E., LeHarzic R., Konig K. 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; 64421Z-64421Z-5

41. Vogel A., Nahen K., Theisen D., Noack J. Plasma Formation in Water by Picosecond and Nanosecond Nd:YAG Laser Pulses-Part I: Optical Breakdown at Threshold and Superthreshold Irradiance. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal*. 1996; 2(4): 847-60.

42. Zimmermann J.A., Mcdevitt T.C. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*. 2014; 16(3): 331-45.

References

- Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N. Studying the Formation of mesospheroids from human somatic cells. *Ontogenez*. 2013; 44(4): 226-27. (in Russian)
- Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kokoltsova T.D., Borzenok S.A., Repin V.S. The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells. *Patogenez*. 2015; 13(2): 4-11. (in Russian)
- Saburina I.N., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Repin V.S. Research of angiogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Patogenez*. 2013; 11(1): 65-8. (in Russian)
- Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the generation gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7(11): 873-84.
- Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(3): 5517-27.
- Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012; 125(13): 3015-24.
- Baumgart J., Bintig W., Ngezahayo A., Willenbrock S., Escobar H.M., Ertmer W., Lubatschowski H., Heisterkamp A. Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells. *Optics Express*. 2008; 16(5): 3021-31.
- Bely A.E. Evolutionary loss of animal regeneration: pattern and process. *Integrative and comparative biology*. 2010; 50(4): 515-27.
- Botvinick E.L., Venugopalan V., Shah J.V., Liaw L.H., Berns M.W. Controlled ablation of microtubules using a picosecond laser. *Biophysics Journal*. 2004; 87: 4203-12.
- Bruns T., Schickinger S., Wittig R., Schneckenburger H. Preparation strategy and illumination of three-dimensional cell cultures in light sheet-based fluorescence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2012; 17: 1015181-1015185.
- Cesarz Z., Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*. 2016; doi:10.1155/2016/9176357
- Clement-Sengewald A., Schutze K., Ashkin A., Palma G.A., Kerlen G., Brem G. Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1996; 13: 259-265.
- Colombelli J., Reynaud E.G., Rietdorf J., Pepperkork R., Stelzer E.H. In vivo selective cytoskeleton dynamics quantification in interphase cells induced by pulsed ultraviolet laser nanosurgery. *Traffic*. 2005; 6: 1093-1102.
- Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001; 294: 1708-1712.
- Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art. *Acta Naturae*. 2015; 7(2): 48-56.
- Frith J.E., Thomson B., Genever P.G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010; 16(4): 735-749.
- Genc S.L., Ma H., Venugopalan V. Low-density plasma formation in aqueous biological media using sub-nanosecond laser pulses. *Applied Physics Letters*. 2014; 105: 063701.
- Gottrup F., Agren M.S., Karlsmark, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*. 2000; 8(2): 83-96.
- Haycock J.W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. *Methods Mol. Biol.* 2011; 695: 1-15.
- Heisterkamp A., Maxwell I.Z., Mazur E., Underwood J.M., Nickerson J.A., Kumar S., Ingber D.E. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Optics Express*. 2005; 13: 3690-96.
- Il'ina I.V., Ovchinnikov A.V., Chefonov O.V., Sitnikov D.S., Agranat M.B., Mikaelyan A.S. Noncontact microsurgery of cell membranes using femtosecond laser pulses for optoinjection of specified substances into cells. *Quantum Electronics*. 2013; 43: 365-69.
- Il'ina I.V., Ovchinnikov A.V., Sitnikov D.S., Chefonov O.V., Agranat M.B. Noncontact microsurgery and delivery of substances into stem cells by means of femtosecond laser pulses. *Quantum Electronics*. 2014; 44: 594-8.
- Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. Application of Femtosecond Laser Scalpel and Optical Tweezers for Noncontact Biopsy of Late Preimplantation Embryos. *High Temperature*. 2015; 53: 804-9.
- Ilina I.V., Khramova Yu.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. Femtosecond Laser Assisted Hatching: Dependence of Zona Pellucida Drilling Efficiency and Embryo Development on Laser Wavelength and Pulse Energy. *High Temperature*. 2016; 54: 46-51.
- Ilina O., Bakker G.-J., Vasaturo A., Hoffman R.M., Friedl P. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. *Physical Biology*. 2011; 8(1): 015010.
- Khodjakov A., La Terra S., Chang F. Laser Microsurgery in Fission Yeast: Role of the Mitotic Spindle Midzone in Anaphase B. *Current Biology*. 2004; 14: 1330-40.
- Kohli V., Elezabi A.Y., Acker J.P. Cell Nanosurgery Using Ultrashort (Femtosecond) Laser Pulses: Applications to Membrane Surgery and Cell Isolation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005; 37: 227-30.
- Konig K., Uchugonova A., Gorjup E. Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of 3D-Stem Cell Spheroids During Differentiation. *Microscopy Research and Technique*. 2011; 74: 9-17.
- Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows. *Journal of Cytology & Histology*. 2015; 6(6): 378.
- Lin R.-Z., Chang H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. 2008; 3: 1172-84.
- Magidson V., Loncarek J., Hergert P., Rieder C.L., Khodjakov A. Laser microsurgery in the GFP era: a cell biologist's perspective. *Methods in Cell Biology*. 2007; 82: 237-66.
- Pampaloni F., Ansari N., Stelzer E.H.K. High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy. *Cell and Tissue Research*. 2013 352(1): 161-77.
- Pampaloni F., Reynaud E.G., Stelzer E.H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8(10): 839-45.
- Rau K.R., Quinto-Su P.A., Hellman A.N., Venugopalan V. Pulsed Laser Microbeam-Induced Cell Lysis: Time-Resolved Imaging and Analysis of Hydrodynamic. *Effects. Biophys. J.* 2006; 91(1): 317-29.
- Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 158(1): 137-44.
- Sacconi L., Tolic-Norrelykke I.M., Antolini R., Pavone F.S. Combined intracellular three-dimensional imaging and selective nanosurgery by a nonlinear microscope. *Journal of Biomedical Optics*. 2005; 10: 014002-014025.
- Shen N., Datta D., Schaffer C.B., LeDuc P., Ingber D.E., Mazur E. Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor. *Mech. Chem. Biosyst.* 2005; 2(1): 17-25.
- Stevenson D., Agate B., Tsampoula X., Fischer P., Brown C.T.A., Sibbett W., Riches A., Gunn-Moore F., Dholakia K. Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency. *Optics Express*. 2006; 14(16): 7125-33.

39. Uchugonova A., Konig K., Bueckle R., Isemann A., Tempea G. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses. *Optics Express*. 2008; 16(0): 9357-64.

40. Uchugonova A., Riemann I., Stracke F., Gorjup E., LeHarzic R., Konig K. 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; 64421Z-64421Z-5

41. Vogel A., Nahen K., Theisen D., Noack J. Plasma Formation in Water by Picosecond and Nanosecond Nd:YAG Laser Pul-

ses-Part I: Optical Breakdown at Threshold and Superthreshold Irradiance. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal*. 1996; 2(4): 847-60.

42. Zimmermann J.A., Mcdevitt T.C. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*. 2014; 16(3): 331-45.

10.05.2015

Development of a spheroid repair model based on nanosecond laser scalpel microsurgery

Kosheleva N.V.^{1,3}, Ilina I.V.², Zurina I.M.¹, Roskova A.E.³, Gorkun A.A.¹, Ovchinnikov A.V.², Agranat M.B.², Saburina I.N.^{1,4}

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

² — Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, 13 Bld.2, Izhorskayast., Moscow, Russian Federation, 125412

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 12-1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119234

⁴ — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., Moscow, Russian Federation, 123995.

E-mail: n_kosheleva@mail.ru

For correspondence: Kosheleva Anastasiya Vladimirovna, n_kosheleva@mail.ru

Modern methods of cell spheroid laser microsurgery were used to develop a new simple and reproducible model for studying mechanisms of repair and regeneration in vitro. Nanosecond laser pulses (wavelength 355 nm, frequency 100 Hz, pulse duration 2 ns) were used to perform microdissection of surface and inner zones of spheroids from human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (BM MMSC). To provide preservation of spheroid viability after effective microdissection, the energy of laser impulses was regulated in the range 7–9 μJ. After microdissection the edges of wound surface for more than 180 degrees, the structure of spheroids was destructed. In a short period of time (2–3 hours), the cells surviving after injury changed their shape. Cells at the surface of spheroid and in the wound area became rounded. The complete restoration of spheroid structure took place over seven days due to remodeling of surviving cells.

Key words: laser microsurgery, multipotent mesenchymal stromal cells spheroids, nanosecond laser scalpel

Сведения об авторах

Кошелева Анастасия Владимировна — к.б.н., старш. научн. сотр.

Ильина Инна Вячеславовна — канд. физ.-мат. наук, старш. научн. сотр.

Зурина Ирина Михайловна — младш. научн. сотр.

Роскова Александра Евгеньевна — студентка

Горкун Анастасия Алексеевна — к.б.н., вед. научн. сотр.

Овчинников Андрей Владимирович — канд. физ.-мат. наук, старш. научн. сотр.

Агранат Михаил Борисович — докт. физ.-мат. наук, заведующий отделом

Сабурина Ирина Николаевна — д.б.н., профессор, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития