

## СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КЕРАТИНОЦИТОВ НАСАТ И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

© А. Н. Великанов,<sup>1,\*</sup> Ф. Е. Гостев,<sup>2</sup> Е. А. Супруненко,<sup>1</sup> И. В. Шелаев,<sup>2</sup>  
В. И. Юсупов,<sup>3</sup> В. А. Надточенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991,

<sup>2</sup>Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, 119991,

и <sup>3</sup>Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Москва, Троицк, 140700;

\* электронный адрес: av-bioem@mail.ru

Изучено влияние фемтосекундных лазерных импульсов на пролиферативную активность кератиноцитов НАСАТ и мезенхимных стромальных клеток (МСК) крысы. Импульсами длительностью 30 фс с длиной волны 590 нм действовали на среду культивирования. Показали зависимость пролиферативной активности клеток от дозы лазерного облучения в диапазоне 6—4299 Дж/см<sup>2</sup>. Пролиферативную активность оценивали по числу клеток через 1 сут после воздействия. Для обеих клеточных культур получены похожие дозовые зависимости: увеличение пролиферации (на 32—54 % для НАСАТ и на 19 % для МСК) происходит при использовании наименьших доз, а при высоких дозах изменения скорости пролиферации клеток нет. Проведенный физико-химический анализ не выявил увеличения концентрации активных форм кислорода в культуральной среде. Воздействие фемтосекундных лазерных импульсов приводило к генерации в культуральной среде акустических колебаний в диапазоне 0.5—6.0 кГц. Предполагается, что увеличение пролиферативной активности клеток может быть вызвано механическим воздействием акустических волн, генерируемых в среде оптическим пробоем в месте фокуса лазерного излучения.

Ключевые слова: лазерные импульсы, фотобиомодуляция, активные формы кислорода, механикобиологические эффекты, стимуляция пролиферации, МСК, кератиноциты НАСАТ.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стромальные клетки.

Влияние лазерного излучения на физиологию клеток вызывает большой интерес. В частности, рассматриваются различные варианты воздействия, приводящие к стимуляции пролиферативной активности (Кару, 2001; Yusupov et al., 2010, 2011; Karu, Passarella, 2014). До недавнего времени широко использовались непрерывные и импульсные лазеры (с длительностью импульса более 10<sup>-9</sup> с), физико-химические эффекты которых сводились к тепловому воздействию — фотохимическому, либо абляции.

В настоящей работе рассматривается воздействие остросфокусированных фемтосекундных лазерных импульсов на культуральную среду, содержащую клетки. В последнее время в биомедицине стали широко использоваться лазеры с ультракороткими импульсами (10<sup>-12</sup>—10<sup>-15</sup> с). Особенностью этого излучения является высокая пиковая плотность мощности, однако за счет малой длительности импульса облучаемый объект получает относительно малую дозу энергии, что позволяет избежать нагрева. Такие характеристики излучения обеспечивают нелинейные оптические взаимодействия и локализацию воздействия в области фокуса лазерного излучения. Высокоинтенсивное излучение сфокусированного фемтосекундного лазера приводит к абляции биологиче-

ских тканей, что позволяет использовать это излучение для прецизионной резки тканей и проведения тонких хирургических операций (Maldonado et al., 2008; Kuetemeyer et al., 2009). Биологическое действие такого излучения на клетки и эмбрионы изучается (Осиченко и др., 2015). Ранее сообщалось (Куо, 2010), что после облучения культуральной среды фемтосекундными лазерными импульсами (20 мкДж, 120 фс) происходит изменение пролиферативной активности клеток, причем один и тот же режим стимулировал одни культуры (P19CL6 и C2C12) и угнетал другие (HeLa и PC12). Однако механизмы, лежащие в основе наблюдаемых биологических эффектов, в упомянутой работе не обсуждаются. Учитывая сказанное, можно говорить о том, что изучение воздействия фемтосекундного излучения на различные модельные объекты и поиск оптимальных условий облучения необходимы в связи с большими практическими перспективами его применения в биологии и медицине.

Задача настоящей работы заключалась в изучении влияния фемтосекундных лазерных импульсов на пролиферативную активность культур кератиноцитов человека НАСАТ и мезенхимных стромальных клеток (МСК) крысы, а также в поиске механизмов, по которым реализу-

## Характеристика режимов облучения

Режим облучения	Параметр				
	частота следования, Гц	время облучения, с	энергия импульса, мкДж	пиковая плотность мощности, Вт/см <sup>2</sup>	доза, Дж/см <sup>2</sup>
1	2	2.5	30	$3.2 \cdot 10^{13}$	6
2	2	5	30	$3.2 \cdot 10^{13}$	12
3	60	2	30	$3.2 \cdot 10^{13}$	143
4	60	60	10	$1.07 \cdot 10^{13}$	1433
5	60	60	30	$3.2 \cdot 10^{13}$	4299

ется такое воздействие. Выбор параметров излучения, использованных в работе, обусловлен имеющимися в литературе данными, а также практической целесообразностью. В частности, излучение с длиной волны 590 нм обычно используется в качестве источника возбуждения многофотонной люминесценции в сканирующей микроскопии (Curley et al., 1992). Культуры кератиноцитов и МСК были выбраны с целью проверки специфичности действия фемтосекундных лазерных импульсов на клетки с разной степенью дифференцировки. При этом учитывалось, что кератиноциты HaCaT являются иммортализованной клеточной линией.

## Материал и методика

**Клетки.** Использовали культуры кератиноцитов человека HaCaT и МСК крысы. Клетки были любезно предоставлены Е. А. Воротея (Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва). Культивирование производили в стандартных условиях, используя среду DMEM/F12, содержащую 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 0.32 мг/мл L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали во флаконах 25 см<sup>2</sup>. За 1 сут до облучения клетки рассаживали в чашки Петри диаметром 3.5 см. Плотность посева составляла 150 000 кл./мл для кератиноцитов и 30 000 кл./мл для МСК. Число клеток во всех экспериментальных группах было одинаковым.

Через 1 сут после облучения проводили подсчет числа клеток в контрольной и экспериментальной группах. Для подтверждения увеличения пролиферативной активности проводили иммуноцитохимическое окрашивание на маркер пролиферации Ki67. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела Anti-Ki67 (Abcam, Великобритания, кат. No ab15580), в качестве вторых антител использовали ослиные поликлональные антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight488 (Abcam, Великобритания, кат. No ab5694). Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Фиксацию производили через 18 ч после облучения. После отмытки фиксатора в фосфатном буфере PBS для блокировки неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), содержащем 1 % Тритона X-100 (Panreac, Испания) и 0.1 % Tween-20, при комнатной температуре в течение 30 мин. Далее клетки инкубировали в растворе первичных антител (в концентрации, рекомендованной производителем) в течение 12 ч при 40 °С, промывали раствором PBS и инкубировали в растворе вторых антител (в концентрации, рекомендованной производителем) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем

отмывали и докрашивали ядерным красителем Hoechst 33342 (2 мкг/мл; Sigma, США) в течение 15 мин. В качестве отрицательного контроля (контроль неспецифического связывания антител) использовали аналогичные препараты, обработанные только вторыми антителами. Для дальнейшего анализа использовали флуоресцентный конфокальный микроскоп Olympus FV10i (Япония). Подсчет Ki67-позитивных клеток проводили в 10 полях зрения.

**Облучение фемтосекундным лазером.** Для облучения образца использовали излучение фемтосекундного параметрического усилителя TOPAS White (Light Conversion Ltd., Литва), накачиваемого фемтосекундным лазерным комплексом на базе фемтосекундного лазера Tsunami (Spectra Physics, США) и регенеративного усилителя Spitfire (Spectra Physics, США). Длина волны облучающего импульса составляла 590 нм, длительность — менее 30 фс, энергия импульса — 10 или 30 мкДж, частота следования — 2 или 60 Гц, время экспозиции — 2 или 60 с. Лазерный луч диаметром около 8 мм фокусировали при помощи сферического зеркала с фокусным расстоянием 200 мм в центре чашки Петри (с клетками на дне) в толще среды на расстоянии 1 мм от дна. Диаметр лазерного пучка в фокусе составлял около 40 мкм. Общий объем среды культивирования в чашки Петри был равен 2 мл, а высота слоя жидкости в чашке составляла 3 мм. Мы использовали пять режимов облучения (см. таблицу) с дозами лазерного воздействия в диапазоне 6—4299 Дж/см<sup>2</sup>. Каждый вариант эксперимента был выполнен не менее чем в 6 повторностях. Для обработки полученных результатов использовали программы Statistica 6.0 и Stadia, анализ достоверности различий проводили при помощи критерия Вилкоксона.

**Гидроакустические измерения.** Для акустических измерений использовали игольчатый пьезоэлектрический гидрофон Müller-Platte Needle Probe (Германия) с преусилителем, предназначенный для регистрации высокочастотного ультразвука и ударных волн в жидкостях в диапазоне 500 кГц—15 МГц. Гидрофон снабжен чувствительным полусферическим наконечником из материала PVDF диаметром порядка 400 мкм. Во время измерений наконечник гидрофона погружали в жидкость и устанавливали на расстоянии 3—10 мм от точки фокусировки лазера. Чувствительность гидрофона обеспечивала регистрацию изменения давления на величину более 1 атм.

Оценку спектральных характеристик механических колебаний, возникающих при взаимодействии фемтосекундных лазерных импульсов с жидкостью, в области звуковых частот производили с помощью оригинального лазерного регистратора возмущений на поверхности жидкости в чашке Петри. Поверхностные возмущения регистрировали по отклонению пучка непрерывного

лазера (0.5 мВт, 650 нм), который фокусировался на поверхности жидкости в пятно  $\sim 10$  мкм на расстоянии 1—12 мм от точки фокусировки фемтосекундного импульса. Отраженный от поверхности жидкости пучок направлялся через диафрагму на фотодиод с полосой частот до 4 МГц. При прохождении поверхностных волн возмущения через область фокусировки отраженный от поверхности волны пучок лазера изменял направление и смещался на диафрагме, вызывая изменение сигнала с фотодиода, который регистрировался с помощью запоминающего осциллографа LeCroy 6051A.

Для измерения содержания активных форм кислорода (АФК) в ростовой среде непосредственно после облучения использовали иодид-иодатный метод (Hochanadel, 1952; Fernandez et al., 2003). Иодид взаимодействует с перексидом водорода по схеме:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 3\text{I}^- + 2\text{H}^+ = \text{I}_3^- + 2\text{H}_2\text{O}$ . Образующийся в результате реакции иодат  $\text{I}_3^-$  имеет пик поглощения при длине волны 354 нм. Градуировка измерений по содержанию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в исследуемом растворе показала чувствительность данного метода в пределах 0.3 мкМ/мл. Иодид-реагент приготавливали перед использованием путем смешивания двух водных растворов А (6.6 % KI, 0.2 % NaOH и 0.04 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) и Б (2 %  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ).

## Результаты и обсуждение

Через 1 сут после облучения нами было обнаружено различие численности клеток в облученных и контрольных образцах клеточных культур кератиноцитов линии HaCaT и МСК. Для кератиноцитов HaCaT увеличение числа клеток (статистически значимое) происходило при использовании первых трех режимов (1—3, см. таблицу) с наименьшими дозами лазерного излучения (рис. 1, а). Как видно на рисунке, наибольшее увеличение числа клеток по сравнению с контрольной группой (на 54 %) произошло в группе, подвергнутой действию излучения в режиме 1 при минимальной дозе 6 Дж/см<sup>2</sup>. Действие лазерного излучения в режиме 1 на МСК крысы тоже привело к увеличению числа клеток (на 19 %) (рис. 1, б). Однако лазерное облучение МСК в больших дозах (режимы 2—5) не изменяло скорость пролиферации клеток по сравнению с контролем.

Проведенное через 18 ч после облучения иммуноцитохимическое окрашивание кератиноцитов на маркер пролиферации Ki67 показало, что в образце, облученном в режиме 2 (рис. 2, а), было на  $38 \pm 21$  % больше делящихся клеток, чем в необлученной контрольной группе (рис. 2, б). Использование этого метода в следующих исследованиях позволит выявить долю клеток в фазе митоза для других режимов в различных временных интервалах после облучения и, таким образом, проследить динамику клеточного ответа на облучение. Кроме того, планируется провести окрашивание МСК на этот же маркер.

В условиях интенсивного фемтосекундного лазерного поглощения, если плотность мощности превышает  $10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup>, возможны многофотонная диссоциация и ионизация молекул воды (Vogel et al., 2005) и компонента культуральной среды в области фокусировки лазерного пучка, что в конечном итоге может сопровождаться образованием АФК перекисного типа. В наших экспериментах плотность мощности достигала  $3.2 \cdot 10^{13}$  Вт/см<sup>2</sup> (см. таблицу). Уровень концентрации пероксида водорода и (или) гидроперекисей, измеренный иодатным колориметрическим методом (Hochanadel et al., 1952), оказался ниже предела чувствительности наших измерений (менее 0.3 мкМ/мл). При такой низкой концентрации АФК ожидать существенного влияния на клеточные процессы не приходится.

При плотности мощности  $3.2 \cdot 10^{13}$  Вт/см<sup>2</sup> в области фокусировки лазерного пучка генерируется плазма высокой плотности (Vogel et al., 2005). Эта плазма поглощает падающее излучение фемтосекундного лазера с высокой эффективностью, и поглощенной энергии импульса может быть достаточно для образования микрокавитационного пузырька в жидкости. Расширение и схлопывание микрокавитационного пузырька генерируют в среде широкополосный (до десятков МГц) акустический сигнал (Vogel et al., 2005). Проведенные нами измерения при помощи игольчатого гидрофона акустических волн в диапазоне 500 кГц—15 МГц показали, что используемые параметры лазерного воздействия не приводят к заметному превышению возникающего акустического сигнала над уровнем шума, а уровень генерирующихся импульсов давления на расстоянии 3 мм от точки фокуса лазера в высокочастотном диапазоне не превышает 1 атм.

Под действием сфокусированных лазерных импульсов на поверхности жидкости наблюдались распростра-

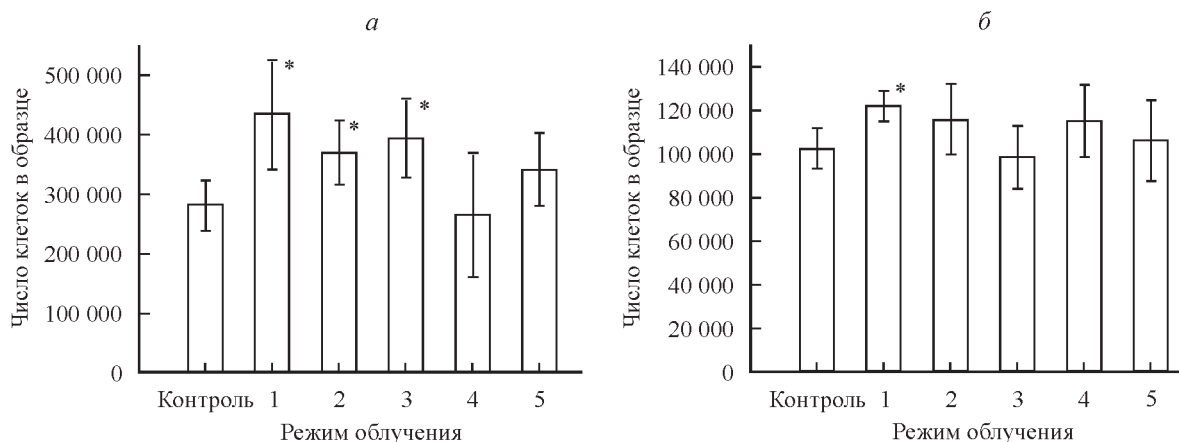


Рис. 1. Среднее число кератиноцитов линии HaCaT (а) и МСК (б) через 24 ч после фемтосекундного лазерного облучения в различных режимах.

Параметры режимов 1—5 указаны в таблице; звездочкой показана достоверность отличия от контроля при  $P < 0.05$ .

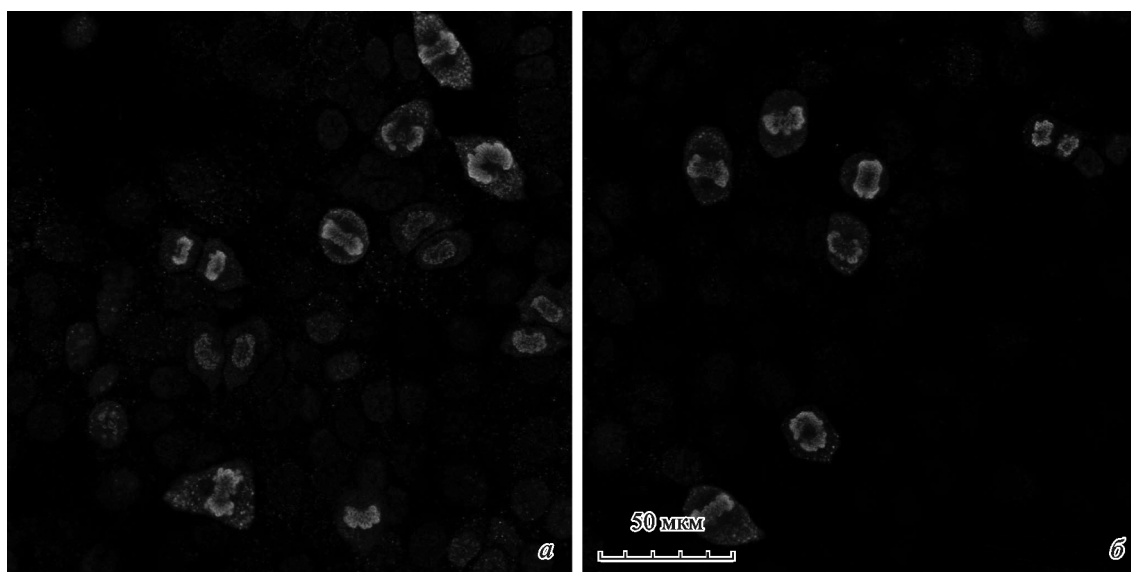


Рис. 2. Кератиноциты HaCaT через 18 ч после фемтосекундного лазерного облучения. Окраска на маркер пролиферации Ki67. а — облученные клетки (10 импульсов, 30 мкДж), б — контроль.

няющиеся из области воздействия капиллярные волны. Качественный анализ спектров сигналов, зарегистрированных с помощью лазерного регистратора возмущений, показал, что энергия этих поверхностных возмущений сосредоточена в диапазоне 0.5—6 кГц (рис. 3).

В литературе обсуждается несколько возможных механизмов биостимуляции, способных приводить к ускорению пролиферации. Первый — фотобиомодуляция — явление, при котором низкоинтенсивный (0.01—100 мВт/см<sup>2</sup>) свет видимого и ближнего инфракрасного диапазонов влияет на ряд процессов в клетке (Кару, 2001; Karu, Passarella, 2014) и вызывает, в частности, изменение уровня АТФ, кальция и экспрессии некоторых генов. Второй механизм — химический, основанный на образовании под действием мощного лазерного импульса АФК. Известно, что увеличение уровня свободных радикалов как в среде, так и внутри живых клеток может приводить к ускорению метаболизма или сопровождать определенные процессы, происходящие в клетке (Voeikov, 2010). Третий возможный механизм — оптомеханический, связанный с воздействием механических колебаний, генерируемых в среде и в биологических тканях, при лазерном излучении (Yusupov et al., 2010, 2011). Исследования показали, что такие механические воздействия существенно влияют на ряд метаболических процессов в клетке (Janmey, McCulloch, 2007; Huang et al., 2010) и могут приводить, в частности, к существенному ускорению пролиферации (Чайлахян и др., 2013).

Опираясь на известные, упомянутые выше механизмы биостимуляции, мы в настоящей работе проанализировали возможность их реализации. Реализация стимуляции по механизму фотобиомодуляции в нашем случае маловероятна, поскольку лазерные импульсы фокусировались на очень маленькой площади, а излучение, образующееся в результате пробоя, имеет очень малую мощность и динамически изменяющийся спектр. Химический механизм также не является в нашем случае причиной стимуляции клеток, поскольку лазерные воздействия не вызвали значимого увеличения концентрации АФК. На наш взгляд, механизм действия фемтосекундных лазер-

ных импульсов на клетки связан с воздействием на них широкополосных механических колебаний за счет оптомеханических эффектов. Известно, что за счет нелинейного оптического эффекта сфокусированные фемтосекундные лазерные импульсы способны создавать быстро расширяющиеся микропузырьки (Schaffer et al., 2002). Генерация акустических волн сфокусированным лазерным импульсом имеет характер точечного источника; так, для импульсов длительностью 100 фс с энергией 1 мкДж область сверхзвукового расширения ограничивается 7 мкм. При указанной энергии пузыри достигают максимального размера в 100 мкм через 5 мкс, при этом общее время существования пузыря составляет 11 мкс. Расширение и схлопывание кавитационного пузырька порождают широкий спектр акустических волн.

В нашей работе исследование возникающего широкополосного спектра акустических колебаний проведено в высокочастотном ультразвуковом (500 кГц—15 МГц)

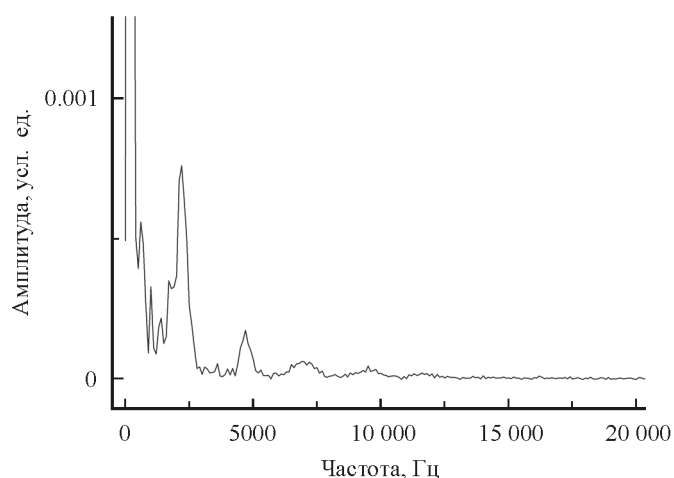


Рис. 3. Спектр мощности, полученный после Фурье-преобразования осциллограммы сигнала фотодиода, регистрирующего интенсивность отраженного от поверхности волн лазерного луча.

и низкочастотном (звуковом) диапазонах. Выполненные при помощи игольчатого гидрофона акустические измерения показали, что уровень генерирующихся в высокочастотном диапазоне импульсов давления на расстоянии 3 мм от точки фокуса лазера не превышает 1 атм. При этом лазерный регистратор поверхностных возмущений выявил наличие механических колебаний в диапазоне 0.5—6.0 кГц. Ранее отмечалось, что акустические импульсные воздействия в звуковом диапазоне частот с амплитудой ~0.003 атм приводят к стимуляции пролиферации клеток (Чайлахян и др., 2013), по-видимому, за счет механобиологических факторов (Yusupov et al., 2011).

Проведенное исследование показало, что воздействие фемтосекундными лазерными импульсами на обе использованные в работе клеточные культуры может приводить к увеличению скорости их пролиферации. Следует подчеркнуть, что для обеих культур получены похожие дозовые зависимости: увеличение пролиферации происходит при использовании наименьших доз, а при высоких дозах изменения скорости пролиферации клеток нет. Так, облучение кератиноцитов линии HaCaT относительно малыми дозами (6, 12 и 143 Дж/см<sup>2</sup>) вызывало увеличение скорости пролиферации, что выражалось через 1 сут после облучения увеличением числа клеток в культуре (рис. 1, а), а также большим числом клеток в фазе митоза клеточного цикла через 18 ч (рис. 2, а). При этом наибольшее увеличение пролиферации (на 54 % по сравнению с контролем) было зарегистрировано при использовании самой малой дозы облучения (6 Дж/см<sup>2</sup>). Облучение кератиноцитов HaCaT самыми большими дозами из используемых (1433 и 4299 Дж/см<sup>2</sup>) не изменяло скорости пролиферации, при этом наблюдалась тенденция к уменьшению скорости пролиферации с увеличением дозы. Подобная картина наблюдалась и для МСК. Так, облучение МСК самой малой из используемых доз (6 Дж/см<sup>2</sup>) тоже увеличивало скорость пролиферации, что выражалось в увеличении числа клеток на 18 % через 1 сут после облучения (рис. 1, б) и характеризовалось большим числом клеток, находящихся в фазе М клеточного цикла, через 18 ч после облучения. Облучение МСК большими дозами (12—4299 Дж/см<sup>2</sup>) не изменяло пролиферацию.

Большой интерес представляют будущий этап исследования и продление дозовой зависимости в область малых доз (меньше 6 Дж/см<sup>2</sup>), поскольку можно ожидать еще большей стимуляции пролиферации клеток. Продление же дозовой зависимости в область больших доз (больше 4299 Дж/см<sup>2</sup>) может привести к уменьшению пролиферации и гибели клеток. Отметим, что в рамках данного исследования остался открытым вопрос о том, какая часть широкополосного спектра акустического сигнала, генерирующегося во время лазерного воздействия, ответственна за обнаруженное увеличение скорости пролиферации. Позитивное терапевтическое воздействие могли бы оказывать высокочастотные ультразвуковые волны, амплитуда которых в диапазоне 500 кГц—15 МГц менее 1 атм, ультразвуковые волны в диапазоне 20—500 кГц (нами не исследованы) или зарегистрированные акустические возмущения в звуковом диапазоне частот 0.5—6.0 кГц.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-25-00055).

## Список литературы

- Karu T. I. 2001. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии. Успехи соврем. биол. 121 (1) : 110—120. (Karu T. I. 2001. Cell mechanisms of low level laser therapy. Biol. Bull. Rev. 121 (1) : 110—120.)
- Osychenko A. A., Zalessky A. D., Krivoharchenko A. S., Shahbazyan A. K., Ryabova A. V., Nadtochenko V. A. 2015. Слияние бластомеров эмбрионов мыши под действием фемтосекундного лазерного излучения. Эффективность образования бластоцист и развития эмбрионов. Квантовая электроника. 45 (5) : 498—502. (Osychenko A. A., Zalessky A. D., Krivoharchenko A. S., Shahbazyan A. K., Ryabova A. V., Nadtochenko V. A. 2015. Merge blastomeres of mouse embryos by femtosecond laser radiation. The efficiency of the blastocyst and embryo development. Quantum Electronics. 45 (5) : 498—502.)
- Чайлахян Р. К., Юсупов В. И., Свиридов А. П., Герасимов Ю. В., Тамбиев А. Х., Воробьева Н. Н., Куралесова А. И., Москвина И. Л., Баграшвили В. Н. 2013. Акустические и КВЧ воздействия на стволовые стромальные клетки костного мозга *in vitro*. Биомед. радиоэлектроника. 2 : 42—45. (Chailakhyan R. K., Yusupov V. I., Sviridov A. P., Gerasimov Yu. V., Tambiev A. H., Vorob'eva N. N., Kuralesova A. I., Moskvina I. L., Bagratashvili V. N. 2013. Acoustic and EHF effects on stromal stem cells of bone marrow *in vitro*. Biomed. Radioelectr. 2 : 42—45.)
- Curley P. F., Ferguson A. I., White J. G., Amos W. B. 1992. Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked Ti-sapphire laser to the field of laser scanning microscopy. Optical Quantum Electronics. 24 : 851—859.
- Fernandez J., Nadtochenko V., Kiwi J. 2003. Photobleaching of Orange II within seconds using the oxone/Co<sup>2+</sup> reagent through Fenton-like chemistry. Chem. Commun. 18 : 2382—2383.
- Hochanadel C. J. 1952. Effects of cobalt  $\gamma$  radiation on water and aqueous solutions. J. Phys. Chem. 56 : 587—594.
- Huang A. H., Farrell M. J., Mauck R. L. 2010. Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. J. Biomech. 43 : 128—136.
- Janmey P. A., McCulloch C. A. 2007. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. Annu. Rev. Biomed. Eng. 9 : 1—34.
- Karu T., Passarella S. 2014. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 140 : 344—358.
- Kuetemeyer K., Baumgart J., Lubatschowski H., Heisterkamp A. 2009. Repetition rate dependency of low-density plasma effects during femtosecond-laser-based surgery of biological tissue. Appl. Phys. B: Lasers Optics. 97 : 695—699.
- Kuo Y., Wu C., Hosokawa Y., Maezawa Y., Okano K., Masuhara H., Kao F. 2010. Local stimulation of cultured myocyte cells by femtosecond laser-induced stress wave. Appl. Phys. A. 101 : 597—600.
- Maldonado M. J., Nieto J. C., Pinero D. P. 2008. Advances in technologies for laser-assisted *in situ* keratomileusis (LASIK) surgery. Expert Rev. Med. Devices. 5 : 209—229.
- Schaffer C., Nishimura N., Glezer E., Kim A., Mazur E. 2002. Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds. Optics Express. 10 : 196—203.
- Voelkov L. 2010. Reactive oxygen species, water, photons and life. Riv. Biol. 103 : 321—342.
- Vogel A., Noack J., Huttman G., Paltauf G. 2005. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. Appl. Phys. B: Lasers Optics. 81 : 1015—1047.
- Yusupov V. I., Chudnovskii V. M., Bagratashvili V. N. 2010. Laser-induced hydrodynamics in water-saturated biotissues. I. Generation of bubbles in liquid. Laser Phys. 20 : 1641—1647.
- Yusupov V. I., Chudnovskii V. M., Bagratashvili V. N. 2011. Laser-induced hydrodynamics in water and biotissues nearby optical fiber tip. In: Hydrodynamics. Harry Edmar Schulz (Ed.). 95—118.

## STIMULATION OF HaCaT KERATINOCYTES AND RATS MESENCHYMAL STROMAL CELLS PROLIFERATION BY FEMTOSECOND LASER PULSES

*A. N. Velikanov,<sup>1</sup> \* F. E. Gostev,<sup>2</sup> E. A. Suprunenko,<sup>1</sup> I. V. Shelaev,<sup>2</sup>  
V. I. Yusupov,<sup>3</sup> V. A. Nadiochenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Biological Faculty of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 199991,

<sup>2</sup> N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, Moscow, 119991,

and <sup>3</sup> Institute on Laser and Information Technologies RAS, Moscow, 140700;

\* e-mail: av-bioem@mail.ru

The influence of femtosecond laser pulses on the proliferative activity of HaCaT keratinocytes and mesenchymal stromal cells (MSC) rats was studied. The growth media was exposed by laser pulses with wavelength 590 nm and duration 30 fs. The dependence of proliferative activity of cells on the dose was showed in the range 6—4299 J/cm<sup>2</sup>. Proliferative activity was assessed by the number of cells after 1 day after exposure. For both cell cultures obtained similar dose dependence: an increase in cell proliferation (32—54 % for HaCaT and 19 % for MSK) occurs when using lower doses, while higher doses no changes the rate of proliferation of cells. Conducted physical and chemical analysis found no increase in the concentration of active forms of oxygen in the culture medium. The impact of femtosecond laser pulses has led to the generation in culture medium acoustic oscillations in the range of 0.5 to 6.0 kHz. It is assumed that the increase in proliferative activity of cells, can be caused by mechanical effects of acoustic waves generated in the environment of optical breakdown in the focus of the laser radiation.

**Key words:** laser pulses, photobiomodulation, reactive oxygen species, mechanobiology, stimulation of proliferation, MSC, keratinocytes HaCaT.