

УДК:616-006.311.04-053.2-085.221

DOI: 10.14427/jipai.2016.4.50

Влияние неселективного бета-адреноблокатора на хемотаксис и активную миграцию клеток *in vitro*, в аспекте лечения ювенильных гемангиом

В.В. Дубенский

ФГОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Российская Федерация

Influence of non-selective beta-adrenoblocker on chemotaxis and migration of cells *in vitro*, in the aspect of the treatment of juvenile hemangiomas

V.V. Dubenskiy

Tver State Medical University, Tver, Russia

Аннотация

Ювенильные гемангиомы (ЮГ) — наиболее распространенные опухоли детского возраста, которые по оценкам различных исследователей встречаются у 3-12% новорожденных, возникающие при локальном развитии значительных нарушений регуляции неоангиогенеза.

Новый подход в фармакотерапии ЮГ основан на эффективности применения бета-адреноблокатора (β -АБ), а местная терапия ЮГ β -АБ представляется наиболее актуальной методикой лечения очаговых поверхностных гемангиом. Понимание механизма антиангиогенного эффекта β -АБ важно для широкого применения при лечении детей с ЮГ.

Учитывая существенный гиперпролиферативный характер роста, вариабельность цитоархитектоники ЮГ и предпосылки для наружного применения β -АБ, выполнено изучение влияния тимолола на активную миграцию клеток *in vitro* в трех линиях клеточных культур: HDMEC – культура эндотелиальных клеток, HaCat – линия кератиноцитов, L-929 – культура фибробластов, хемотаксис изучался в культуре эндотелиальных клеток (HDMEC).

Проведенные экспериментальные исследования *in vitro* указывают на полное отсутствие негативного влияния тимолола на жизнеспособность, миграцию и подвижность эндотелиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов. Результаты исследований свидетельствуют о безопасности применения неселективного бета-адреноблокатора и отсутствие прямого негативного влияния на клетки, что в совокупности с высокой эффективностью, позволяет рекомендовать использование тимолола для терапии очаговых поверхностных ювенильных гемангиом.

Ключевые слова

Ювенильные гемангиомы, новообразования кожи, бета-адреноблокаторы, хемотаксис, иммуногистохимия, цитокины, CD23, факторы роста, ангиогенез

Summary

Juvenile hemangiomas (JG) - the most common tumor of childhood, which is estimated by various investigators found in 3-10% of newborns resulting from the local development of significant violations of neoangiogenesis regulation.

A new approach in the pharmacotherapy of juvenile hemangiomas (JG) is based on the efficacy of beta-adrenoblocker (β -AB), and the local therapy of juvenile hemangiomas (JG) by beta-adrenoblocker (β -AB) is the most topical method of treatment of focal superficial hemangiomas. Understanding of the mechanism of antiangiogenic effect of β -AB is important for widespread use in the treatment of children with juvenile hemangiomas (JG).

Given the significant hyperproliferative growth patterns, variability of cytoarchitectonic juvenile hemangiomas (JG) and prerequisites for external application of beta-adrenoblocker (β -AB), performed a study of the influence of timolol on active migration *in vitro* cell cultures in three lines: HDMEC - culture of endothelial cells, HaCat - line keratinocytes, L-929 - culture of fibroblasts, chemotaxis was studied in cultured endothelial cells (HDMEC).

Experimental tests *in vitro* indicate the total absence of negative influence on the viability of timolol, mobility and migration of endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. The results of the studies testify to the safety of nonselective beta-adrenoblocker and the absence of a direct negative effect on the cells, which in combination with high efficiency, allows to recommend the use of timolol for the treatment of focal superficial juvenile hemangiomas.

Keywords

Juvenile hemangiomas, skin neoplasia, beta-adrenoblockers, chemotaxis, immunohistochemistry, cytokines, CD23, growth factors, angiogenesis

Введение

Ювенильные гемангиомы (гемангиомы новорожденных, младенческие гемангиомы) — самые распространенные опухоли детского возраста, которые по оценкам различных исследователей встречаются у 3–12% младенцев, принадлежащих к европеоидной расе [1–4]. Ювенильные гемангиомы (ЮГ) — это доброкачественные сосудистые опухоли, возникающие при локальном развитии значительных нарушений регуляции неангиогенеза [1–4].

В 85–90% случаев ЮГ подвергаются спонтанному регрессу до возраста 6–9 лет [1–5]. Механизм самостоятельной инволюции ЮГ остается недостаточно изученным. Известно, что регресс ЮГ связан с морфологической перестройкой опухоли и увеличением числа тучных клеток [1–3, 5]. В 10–15% случаев ЮГ требуют лечения при локализации в области дыхательных путей или развития локальных осложнений (изъязвление и кровотечение), грубого косметического дефекта и психологической дезадаптации, прежде всего родителей больного [4].

Регуляция ангиогенеза — это сложный многофакторный нелинейный процесс, однако в качестве главных медиаторов можно выделить два цитокина: VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста и bFGF — фактор роста фибробластов β , который повышается в фазу быстрой пролиферации, а затем полностью исчезает в фазы стабилизации и инволюции [3–5].

При иммуноморфологическом исследовании выявляются эндотелиальные клетки, которые экспрессируют CD31 (фактор фон Виллебранда), интегрин- α , IGF-2 (инсулиноподобный фактор роста-2) и VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста). В фазе инволюции значительно повышена экспрессия TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase, тканевой ингибитор металлопротеиназ) — ингибитора ангиогенеза [5].

При иммуногистохимических (ИГХ) исследованиях гемангиом установлено значение активации проводящего пути HIF-2 α (фактора, индуцируемого гипоксией) и, как следствие, повышенная экспрессия VEGF эндотелиальными клетками [5]. Фенотип клеток гемангиомы при ИГХ представляет собой сочетание мультипотентных стволовых клеток (CD133+), незрелых клеток эндотелия (CD31+), перицитов (SMA+) и мезенхимных клеток с адипогенным потенциалом. Кроме этого, в опухоли также присутствуют мастоциты и миелоидные клетки [5].

До настоящего времени методы лечения ЮГ включали оперативные методики (эксцизия, эм-

болизация, лазерное или электрохирургическое удаление, криодеструкция и склеротерапия) и консервативные методы лечения. При обширных сегментарных или осложненных гемангиомах, показана системная терапия. Средствами выбора ранее служили глюкокортикостероиды, которые применялись системно (преднизолон или метилпреднизолон) или внутривенно (двухфазный бетаметазон, триамцинолон). При отсутствии эффекта от гормональной терапии назначался препарат второй линии — интерферон, а при его неэффективности — винкристин [4–6].

Глюкокортикоиды эффективны в фазу пролиферации при высоком уровне VEGF, являющемся главной мишенью для глюкокортикостероидов [6, 7]. Они тормозят рост опухоли и уменьшают ее размеры. Частота стабилизации и неполной ремиссии достигает 30–60% с первыми признаками улучшения на 2–3-й недели. Преднизолон *per os* обычно назначается в дозе 5 мг/кг в течение 6–9 недель, затем в дозе 2–3 мг/кг еще 4 недели, альтернирующий прием — следующие 6 недель. Глюкокортикостероиды при таком режиме дозирования должны отменяться постепенно во избежание адреналового криза и возобновления роста гемангиомы [7]. Интерферон альфа-2а или 2б (1×10^6 — 3×10^6 ед/м²) индуцирует раннюю инволюцию больших гемангиом, блокируя миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток, а также фибробластов за счет снижения продукции коллагена и основного фактора роста фибробластов, с первыми признаками регрессии после 2–12 недель лечения [5, 6]. Эффективность винкристина при лечении ювенильных гемангиом высока при режиме дозирования 0,05–1 мг/м² инфузионно 1 раз в неделю, при этом начальные признаки инволюции появляются через 3 недели лечения [5, 6].

Однако при использовании указанных средств нередко возникают серьезные нежелательные явления и побочные эффекты. При лечении преднизолоном — катаракта, гипертрофическая кардиомиопатия, диабет, стеатоз печени; при лечении интерфероном — лихорадка, миалгия, лейкопения, гемолитическая анемия, интерстициальный нефрит, значительные неврологические нарушения. Вместе с тем при использовании указанных средств при риске развития серьезных системных или местных осложнений не всегда удается достичь желаемого лечебного результата [5, 6].

Большой интерес вызывали новые данные о перспективном средстве для фармакотерапии сосудистых новообразований — пропранололе,

который давно известен в качестве антигипертензивного препарата и используется не только у взрослых для лечения гипертензии, но и у детей при кардиальной патологии. Первое описание случайной находки ангиангиогенного эффекта пропранолола – неселективного бета-блокатора (β -АБ), произвело революцию в подходе к лечению гемангиом и опубликовано сотрудниками госпиталя г. Бордо (Франция) во главе с С. Léauté-Labrèze в 2008 году [8].

Как сообщила С. Léauté-Labrèze и соавт. в процессе лечения гемангиомы носа у ребенка системными глюкокортикоидами у него развилась гипертрофическая кардиомиопатия, в связи с чем был назначен пропранолол. На следующий день после начала лечения пропранололом было отмечено, что опухоль стала мягче и темнее. Доза кортикостероидов, которые применяли для лечения гемангиомы, была снижена, но опухоль продолжала уменьшаться. После прекращения лечения кортикостероидами рост гемангиомы не возобновлялся, а поверхность ее стала абсолютно плоской к 14-му месяцу жизни ребенка [8].

Второе наблюдение в этом же госпитале было сделано у ребенка с гемангиомой, которая закрывала правый глаз. Несмотря на лечение кортикостероидами, опухоль продолжала увеличиваться. Помимо этого, МРТ выявило наличие новообразований шеи, вызывающих обструкцию трахеи и пищевода. Эхография сердца установила увеличение сердечного выброса, в связи с чем было начато лечение пропранололом в дозе 2 мг/кг/сутки. Семь дней спустя ребенок был в состоянии открыть правый глаз. После того как от родителей было получено письменное информированное согласие, пропранолол стали применять еще у девяти детей с тяжелыми или осложненными гемангиомами. У всех пациентов через 24 ч после начала лечения наблюдались изменения цвета гемангиом с интенсивно красного на фиолетовый и ощутимое снижение плотности опухоли. После этого гемангиомы продолжали регрессировать, пока не становились плоскими, с остаточными телеангиэктазиями на поверхности кожи. О выраженных системных побочных эффектах не сообщалось [5].

Кроме системного применения β -АБ, сегодня накоплен значительный опыт топической терапии очаговых поверхностных ювенильных гемангиом. Наибольшая клиническая эффективность при местном лечении ЮГ, установлена для неселективного бета-адреноблокатора – тимолола [9].

Местная терапия ЮГ β -АБ представляется наиболее актуальной методикой лечения, т.к.

исследования распространенности и клинико-функциональных особенностей, установили превалирование поверхностных и очаговых форм ЮГ (рис. 1-2) [10-12].

В ряде исследований установлена безопасность терапии топическими средствами содержащие β -АБ, но до сегодняшнего дня остаются не вполне ясными механизмы индукции регресса ЮГ при лечении средствами данной группы [3, 4, 9].

Имеются две гипотезы, объясняющие антиангиогенный эффект – бета-блокатор может угнетать пролиферацию эндотелиальных клеток и вызывать их апоптоз или же влиять на цитокиновое окружение и тем самым опосредованно угнетать деление эндотелиоцитов [4].

Ранее проведенные нами исследования цитотоксичности тимолола в культурах эндотелиальных клеток (ЭК), кератиноцитов (КЦ) и фибробластов (ФБ) на основании измерения оптической плотности лактатдегидрогеназы (LDH-тест), установило низкие показатели цитолиза *in vitro* (СТ <50%), что указывает на отсутствие прямого цитотоксического эффекта тимолола. Изучение активности клеток *in vitro* при инкубации с тимололом (WST-1, модифицированный МТТ-тест) в культурах клеток показало отсутствие негативного влияния тимолола на метаболизм клеток и отсутствие цитостатического эффекта в отношении трех клеточных линий *in vitro* [13].

Цель исследования: изучить степень влияния тимолола на хемотаксис и активную миграцию эндотелиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов *in vitro*.

Материалы и методы

Учитывая существенный гиперпролиферативный характер роста, варибельность цитоархитектоники ЮГ и предпосылки для наружного применения β -АБ, выполнено изучение влияния тимолола на активную миграцию клеток *in vitro* в трех линиях клеточных культур: HDMEC – культура эндотелиальных клеток, HaCat – линия кератиноцитов, L-929 – культура фибробластов, хемотаксис изучался в культуре эндотелиальных клеток (HDMEC). Достоверность отличий результатов исследований оценена при однофакторном дисперсионном анализе с использованием апостериорного критерия Дункана.

Исследования проведены в рамках стипендии Президента Российской Федерации для обучения за рубежом в 2013/14 учебном году (протокол от 25 июня 2013 г. №2) в клеточной лаборатории Института экспериментальной и

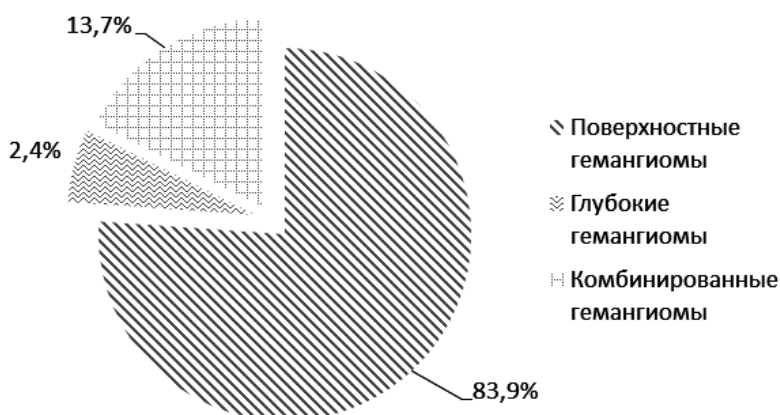


Рис. 1. Формы ювенильных гемангиом.

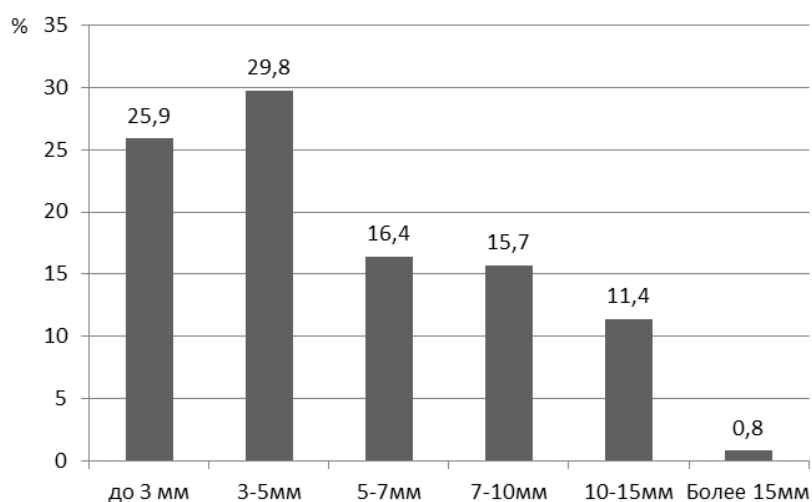


Рис. 2. Глубина ювенильных гемангиом (по результатам УЗИ).

клинической хирургии медицинского факультета Университета земли Саар (Германия).

Влияние на хемотаксис ЭК изучено для 1, 10 и 100 мкмоль/л тимолола. Эксперимент проведен в трансвелл-планшетах, лунки которых с помощью съёмных вставок были разделены на две камеры – верхнюю и нижнюю. Стенки вставок выполнены из сплошного инертного пластика, а дно представлено полимерной мембраной, с порами диаметром 5 мкм. Выбор размера пор обусловлен диаметром изучаемых клеток – они должны быть достаточно малы, чтобы не допускать пассивного «проваливания» клеток под действием силы тяжести, но при этом их размер в соответствии характером пластичности ЭК не должен препятствовать их активной миграции в нижнюю камеру планшета.

Клетки линии HDMEC инкубировались в комплексе с питательной средой ECGM-MV в течение 24 часов, после чего материал переносился в трансвелл-планшеты. В нижние камеры лунок с массой ЭК вводился тимолол в количестве 1, 10 и 100 мкмоль/л, после чего осуществлялась инкубация в течение 5 часов при 37°C и 5% CO₂. Контрольными образцами служили лунки с культурой клеток и питательной средой в нижней камере.

Через 5 часов инкубации выполнен подсчёт клеток, осуществивших активную миграцию через поры на обратную поверхность вставок. Мигрировавшие клетки переносились на предметное стекло и окрашивались по Романовскому-Гимзе, после чего микроскопически осуществлялось их количественное определение в 10 полях зрения для каждого из изучаемых образцов.

Интенсивность хемотаксиса ЭК под влиянием тимолола выражена в индексе хемотаксиса (IX) – отношение количества мигрировавших клеток при инкубации линии клеток с исследуемым веществом к количеству клеток, осуществивших спонтанную миграцию в лунках с питательной средой.

Индекс хемотаксиса рассчитывался по формуле:

$I_x = \frac{\text{среднее количество клеток, мигрировавших в ответ на изучаемое вещество}}{\text{среднее количество клеток, мигрировавших в ответ на питательную среду}}$

Исследование влияния тимолола на миграцию клеток *in vitro* выполнено методом механического повреждения конфлюэнтного монослоя в культурах эндотелиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов.

Для эксперимента были подготовлены культуры клеток в чашках Петри с числом $5 \cdot 10^5$ клеток/чашку. Инкубация (37°C, 4,9% CO₂) осуществлялась в течение 2 суток до формирования необходимой плотности клеток, полученные культуры высевались на предметные стекла в объеме 10 мкл с числом $8 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$ КЦ, ЭК и ФБ, соответственно. Через 4 часа добавлялась питательная среда (Dulbecco's MEM), дистиллированная вода как контроль и тимолол в объеме 10 мл.

Через сутки инкубации с помощью одноразовых пипеток производилось «повреждение» конфлюэнтного монослоя в виде прямой поперечной линии шириной 0,5мм. Интенсивность миграции

оценивалась микроскопически в интервалы 0, 6, 12, 22, 32 и 48 часов. Анализ и микрофотографии монослоя производились с помощью микроскопа «Bio Zero» Keyence (Япония) и программной среды «BioZero Application».

На основании динамики изменения площади «повреждения» монослоя, рассчитывался индекс угнетения миграции (ИУМ, IUM) – отношение процента площади, оставшейся свободной от мигрировавших клеток, к исходной – свободной от клеток непосредственно после повреждения монослоя.

Результаты исследований

При анализе влияния тимолола на хемотаксис ЭК установлено, что количество клеток линии HDMEC осуществивших миграцию через поры на обратную поверхность вставок трансвелл-планшета после инкубации в течение 5 часов с введением тимолола (рис. 3), не отличалось при 1, 10 и 100 мкмоль/л тимолола ($20,77 \pm 5,38$; $20,4 \pm 7,56$ и $22,87 \pm 5,67$ клеток в поле зрения, соответственно; $p=0,001$) от количества спонтанно мигрировавших клеток в контроле ($23,55 \pm 5,7$ клеток в поле зрения; $p=0,001$, рис. 4). Совокупный IX составил 0,9, что указывает на отсутствие влияния тимолола на хемотаксис ЭК *in vitro*.

Изучение миграции ЭК в модели «повреждения» монослоя культуры HDMEC (рис. 5) в присутствии тимолола и контроля – Aq. dest., свидетельствует о сопоставимой площади зоны свободной от ЭК при исследовании через 0 и 6 часов ($p=0,001$). Площадь дефекта в культуре с тимололом через 12 часов после на-

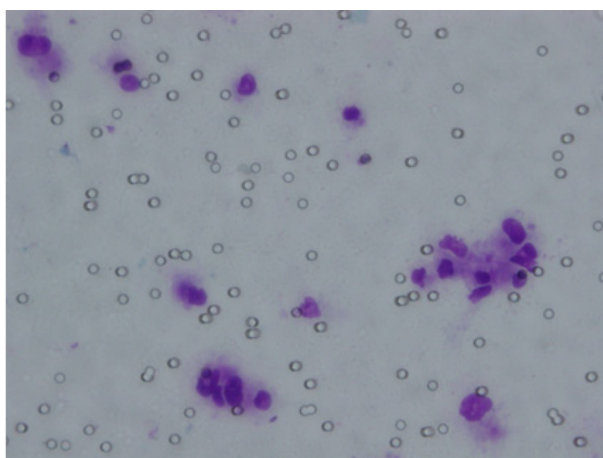


Рис. 3а. Миграция клеток HDMEC в присутствии ECGM-MV, окраска по Романовскому-Гимзе x1000.

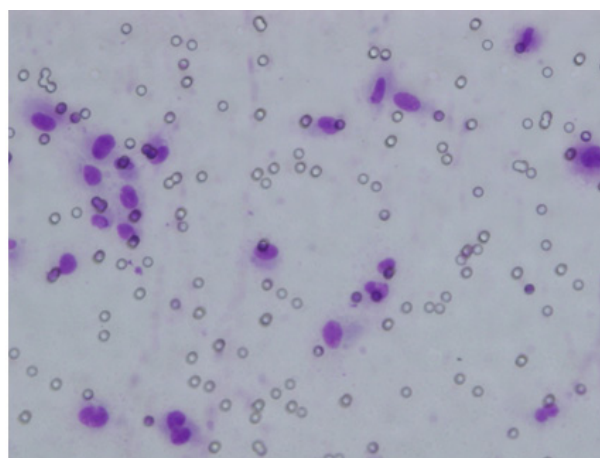


Рис. 3б. Миграция клеток HDMEC в присутствии 100 мкмоль/л тимолола, окраска по Романовскому-Гимзе, x1000.

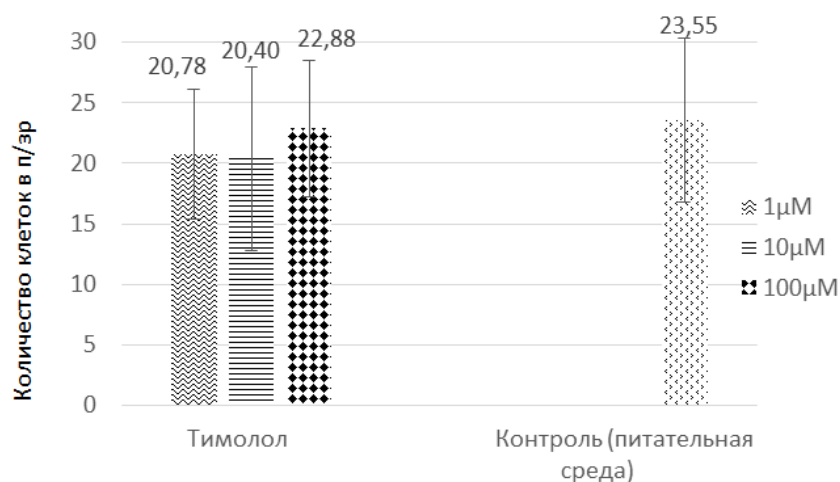


Рис. 4. Количество клеток линии HDMEC осуществивших миграцию.

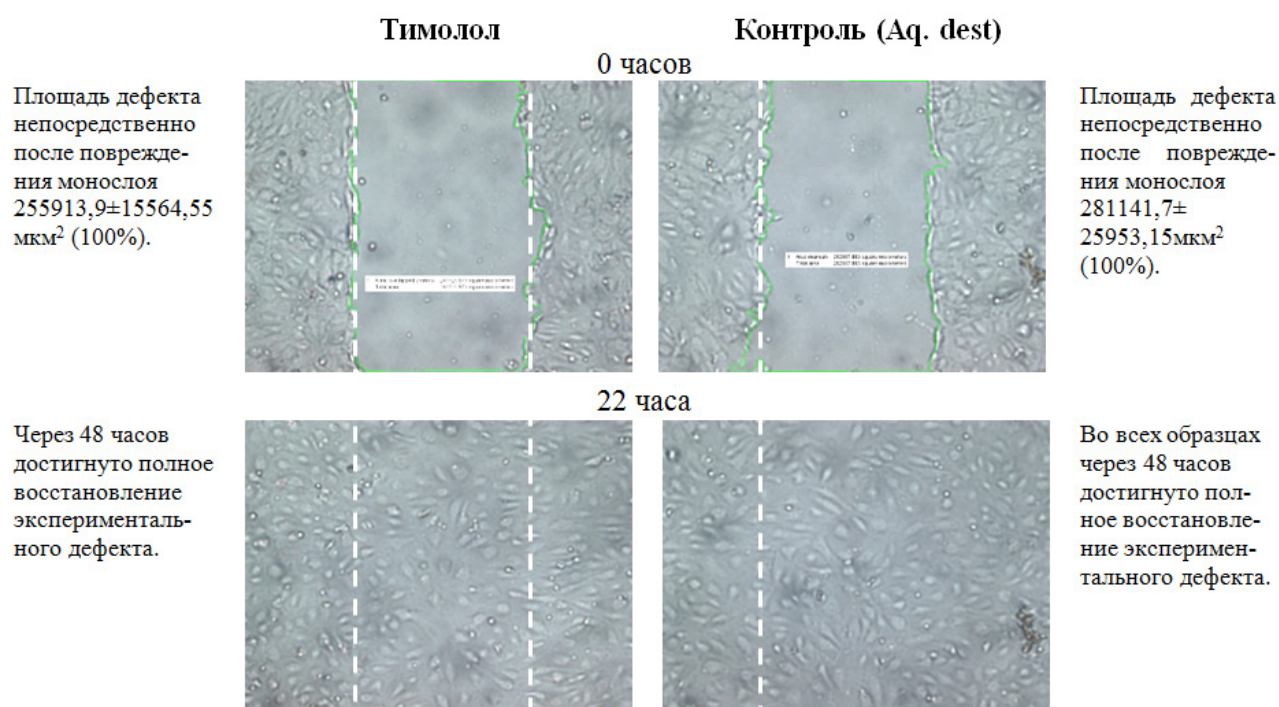


Рис. 5. Модель повреждения конфлюэнтного монослоя в культуре ЭК (HDMEC).

несения повреждения монослоя была меньше чем в контроле ($153629,589 \pm 20256,7711 \mu\text{m}^2$ и $188910,172 \pm 27131,7641 \mu\text{m}^2$, соответственно; $p=0,001$). Однако через 22 часа установлено полное восстановление конфлюэнтности монослоя ЭК в каждой экспериментальной серии во всех исследуемых образцах.

Динамика ИУМ в модели повреждения монослоя ЭК (рис. 6) свидетельствует о сопоставимых показателях и скорости восстановления конфлю-

энтности монослоя ЭК в присутствии тимолола и дистиллированной воды.

Изучение миграции ФБ в модели «повреждения» монослоя культуры L929 (рис. 7) в присутствии тимолола и Aq. dest., свидетельствует о сопоставимой площади зоны свободной от ФБ при исследовании в интервалы 0, 12 и 22 часа ($p=0,001$). Через 32 часа после нанесения повреждения монослоя ФБ в ряде исследуемых и контрольных образцах установлено полное

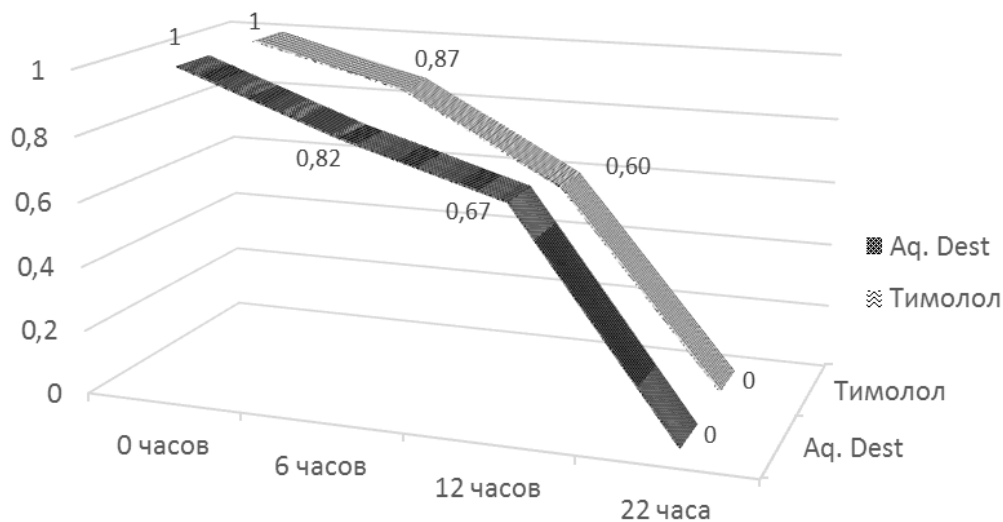


Рис. 6. Динамика I_{ум} в модели повреждения монослоя ЭК.

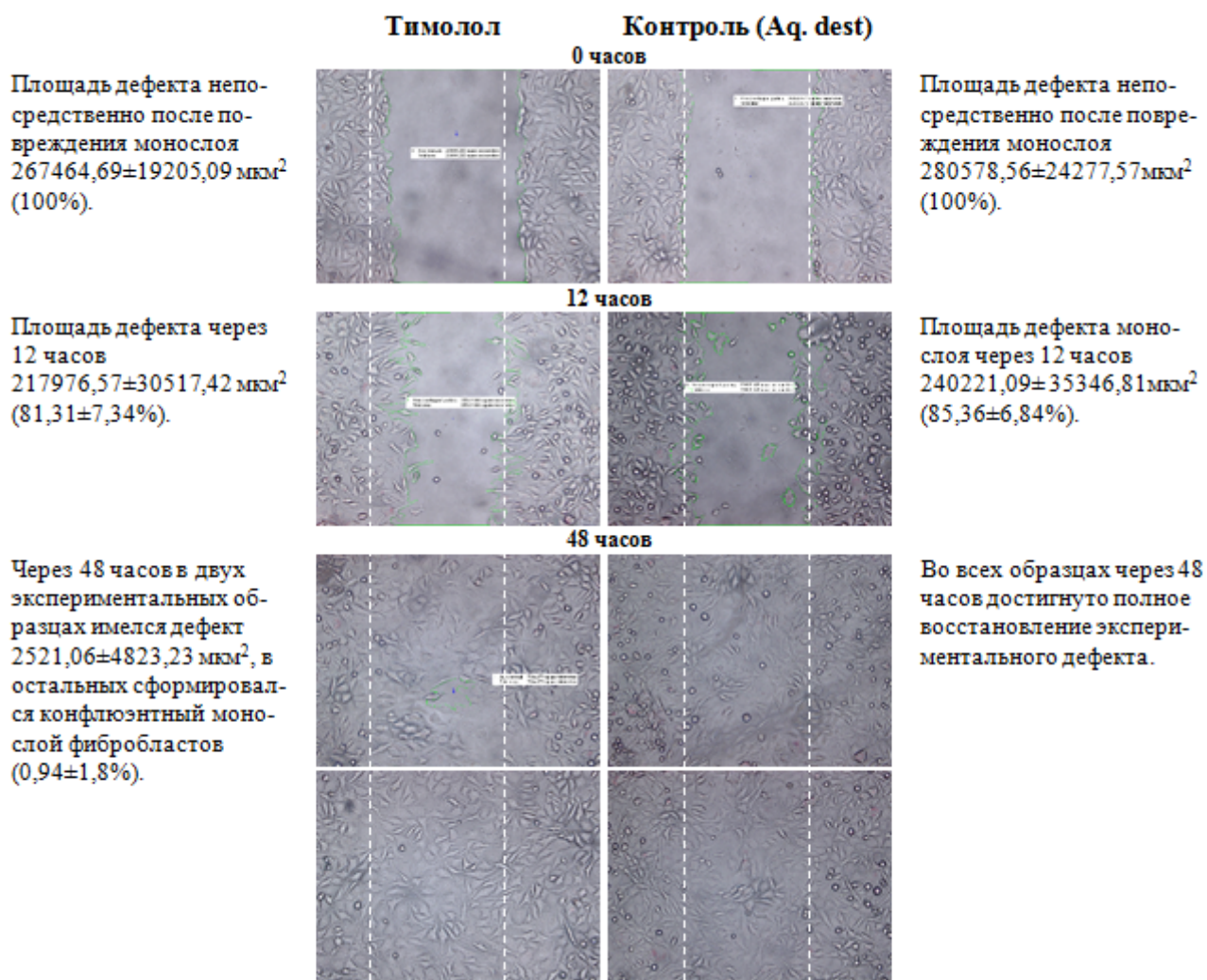


Рис. 7. Модель повреждения конфлюэнтного монослоя в культуре ФБ (L929)

восстановление конфлюэнтного монослоя, в других сохранялся незначительный дефект площадью $23580,37 \pm 26860,42$ мкм² (при инкубации с тимололом). В контроле остаточная площадь дефекта была сопоставима ($6470,27 \pm 15568,98$ мкм², $p=0,001$) и составила $2,09 \pm 4,9\%$ от первоначального повреждения. После 48 часов инкубации с тимололом в двух экспериментальных образцах имелся остаточный дефект площадью $2521,06 \pm 4823,23$ мкм², в остальных также, как и во всех контрольных образцах (Aq. dest.) сформировался конфлюэнтный монослой фибробластов.

Таким образом, в интервале 48 часов отмечено достоверное отличие ($p=0,001$) площади дефекта в контрольных и исследуемых образцах, однако разница составила менее 1% ($0,94 \pm 1,8\%$) от исходного дефекта. Динамика I_{ym} в культуре ФБ (рис. 8) и разница менее 1% в скорости восстановления конфлюэнтности монослоя в экспериментальной и контрольной сериях, свидетельствуют об отсутствии влияния тимолола на активность миграции ФБ in vitro.

Изучение миграции КЦ в модели «повреждения» монослоя культуры HaCat (рис. 9) в экспериментальной серии (в присутствии тимолола) и контрольной (с Aq. dest.), свидетельствует о сопоставимой динамике изменения площади зоны свободной от КЦ при исследовании во все интервалы времени – 0, 6, 20, 32 и 48 часов ($p=0,001$). Через 32 часа после повреждения монослоя КЦ во всех исследуемых образцах (в присутствии тимолола) установлено полное восстановление конфлюэнтности клеток, при этом в контроле – отмечается дефект $5,02 \pm 8,07\%$ от исходного,

однако дисперсионный анализ не установил статистических отличий в разнице площадей изучаемых образцов ($p=0,001$).

Динамика I_{ym} в культуре КЦ (рис. 10) свидетельствует о сопоставимых показателях и скорости восстановления конфлюэнтности монослоя в присутствии тимолола и дистиллированной воды.

Обсуждение

Ювенильные гемангиомы — самые распространенные опухоли детского возраста, которые по оценкам различных исследователей встречаются у 3-10% новорожденных, возникающие при локальном развитии значительных нарушений регуляции неоангиогенеза.

До настоящего времени методы лечения ЮГ включали различные по эффективности методики, в т.ч. методы оперативного удаления, применение глюкокортикостероидов и цитостатиков, при лечении которыми имеются существенные нежелательные явления и осложнения.

Новый подход в фармакотерапии ЮГ основан на эффективности применения β -АБ, а местная терапия ЮГ β -АБ представляется наиболее актуальной методикой лечения очаговых поверхностных гемангиом в практике дерматовенеролога.

В ряде исследований установлена безопасность терапии топическими средствами содержащие β -АБ, но до сегодняшнего дня остаются не вполне ясными механизмы индукции регресса ЮГ при лечении средствами данной группы.

Понимание механизма антиангиогенного эффекта β -АБ важен для широкого применения

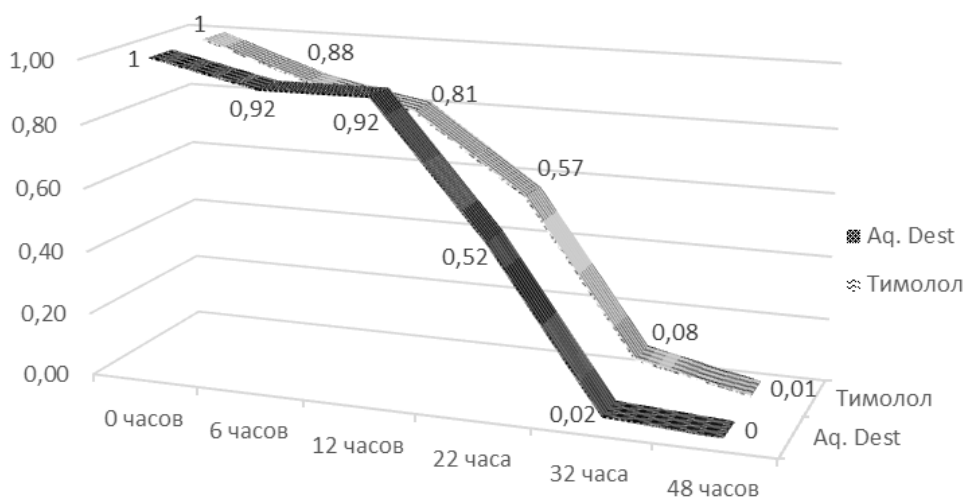


Рис. 8. Динамика I_{ym} в модели повреждения монослоя ФБ.

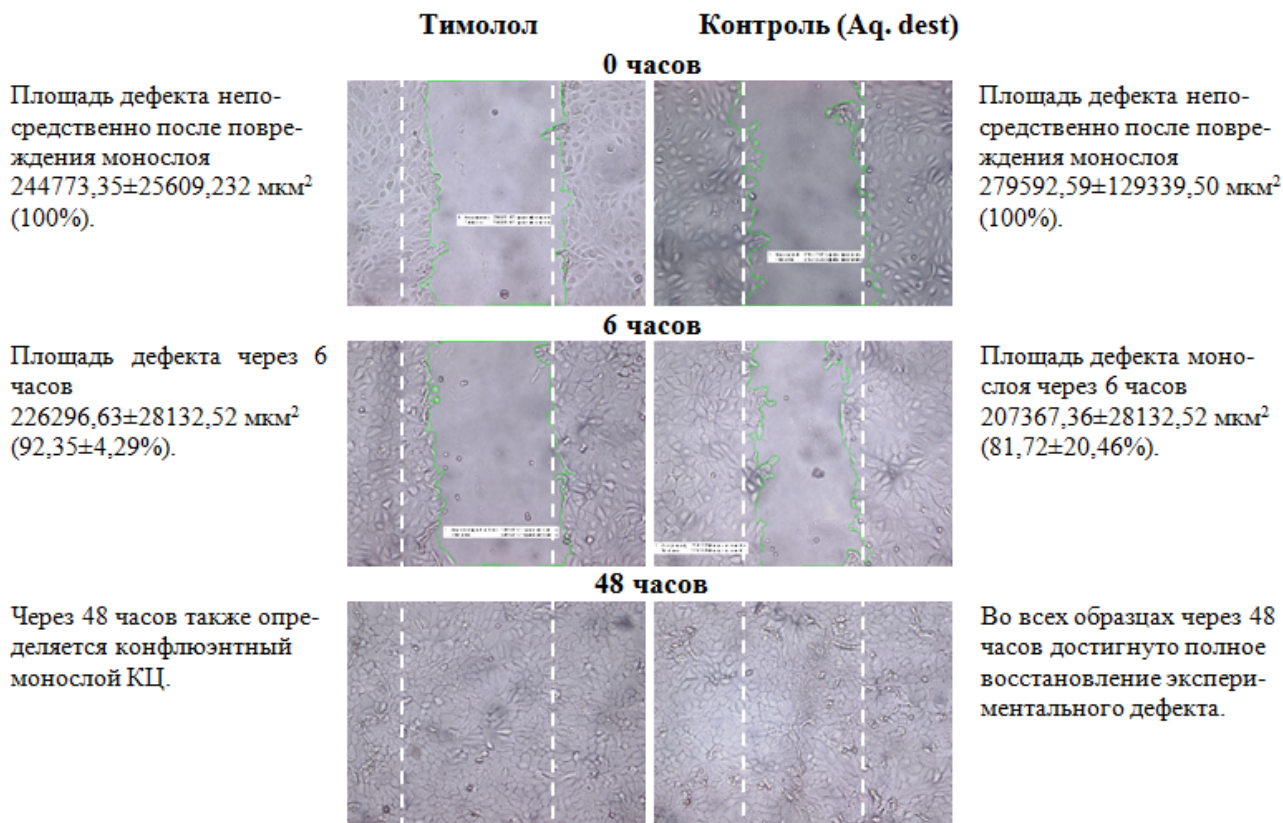


Рис. 9. Модель повреждения конфлюэнтного монослоя в культуре КЦ (HaCat).

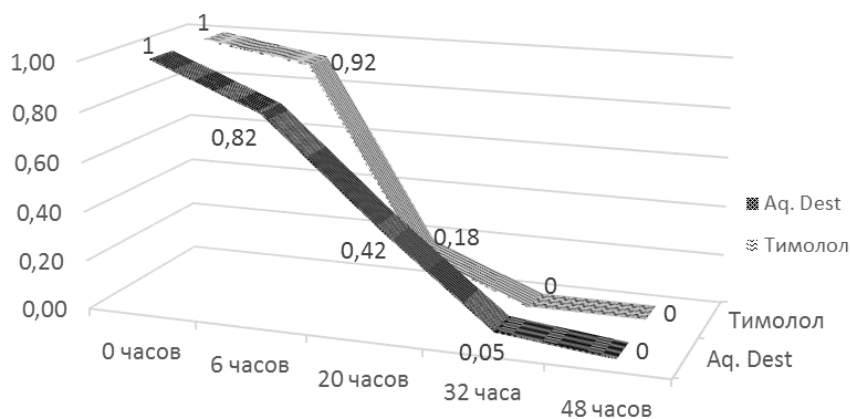


Рис. 10. Динамика IUM в модели повреждения монослоя КЦ.

при лечении детей с ЮГ, т.к. одна из гипотез эффективности основана на прямом апоптозе эндотелиоцитов.

Учитывая существенный гиперпролиферативный характер роста ЮГ выполнено исследование влияния тимолола (1, 10 и 100 мкмоль/л) на хемотаксис и активную миграцию клеток в культуре ЭК (HDMEC). Установлено, что количество клеток линии HDMEC осуществивших

миграцию через поры на обратную поверхность вставок трансвелл-планшета после инкубации в течение 5 часов с введением тимолола, не отличалось при 1, 10 и 100 мкмоль/л тимолола (20,77±5,38; 20,4±7,56 и 22,87±5,67 клеток в поле зрения, соответственно; p=0,001) от количества спонтанно мигрировавших клеток в контроле (23,55±5,7 клеток в поле зрения; p=0,001). Совокупный IX составил 0,9, что указывает на

отсутствие влияния тимолола на хемотаксис ЭК *in vitro*.

Характер влияния тимолола на миграцию клеток *in vitro* изучен при экспериментальном повреждении конфлюэнтного монослоя культуры клеток. Учитывая вариабельность цито-архитектоники ЮГ, изучение миграции клеток в монослое под влиянием тимолола выполнено в культурах эндотелиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов.

I_{YM} в модели повреждения монослоя ЭК свидетельствует о сопоставимых показателях и скорости восстановления конфлюэнтности монослоя ЭК.

Миграции ФБ культуры L929 в присутствии тимолола и Aq. dest., свидетельствует о сопоставимой площади зоны свободной от клеток при исследовании в интервалы 0, 12 и 22 часа ($p=0,001$). В интервале 48 часов в контрольных образцах и ряде экспериментальных установлено полное восстановление конфлюэнтного монослоя. Динамика I_{YM} в культуре ФБ и скорость восстановления конфлюэнтности монослоя в экспериментальной и контрольной сериях, свидетельствует об отсутствии влияния тимолола на активность миграции ФБ *in vitro*.

При изучении миграции КЦ монослоя культуры HaCat через 32 часа после повреждения

во всех исследуемых образцах установлено полное восстановление конфлюэнтности клеток, что свидетельствует о сопоставимой динамике изменения площади дефекта во все интервалы времени. I_{YM} в модели повреждения монослоя КЦ указывает на отсутствие негативного влияния тимолола на подвижность КЦ *in vitro*.

Таким образом, при исследованиях *in vitro* не установлено отрицательное влияние тимолола на хемотаксис и миграцию в трех линиях клеток: HDMEC – культура эндотелиальных клеток, HaCat – линия кератиноцитов, L-929 – культура фибробластов.

Выводы

Проведенные экспериментальные исследования *in vitro* указывают на полное отсутствие негативного влияния тимолола на жизнеспособность, миграцию и подвижность эндотелиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов. Результаты исследований свидетельствуют о безопасности применения неселективного бета-адреноблокатора и отсутствие прямого негативного влияния на клетки, что в совокупности с высокой эффективностью, позволяет рекомендовать использование тимолола для терапии очаговых поверхностных ювенильных гемангиом.

Литература

1. Дубенский, В.В. Новое в патогенезе ювенильных гемангиом. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии, косметологии. 2013; (3): 26-31.
2. Mulliken, JB., Fishman SJ., Burrows PE. Vascular anomalies. *Curr. Probl. Surg.* 2000; 519.
3. Léauté-Labrèze C., Prey S., Ezzedine K. Infantile haemangioma: Part I. Pathophysiology, epidemiology, clinical features, life cycle and associated structural abnormalities. *Journal of the european academy of dermatology and venereology.* 2011; 25 (11): 1245–1253.
4. Поляев Ю. А., Постников С. С., Мыльников А. А. и др. Новые возможности в лечении инфантильных гемангиом с помощью пропранолола. *Международный медицинский журнал.* 2012; (2): 94-102.
5. Дубенский Вл.В. Этиопатогенез и морфология ювенильных гемангиом. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2014; (4): 8-12.
6. Oak S. N., Viswanath K. Management of hemangioma in children. *Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol.* 2006;18 (72): 1–4.
7. Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile haemangioma derived stem cells. *N. Eng. J. Med.* 2010; 362 (11):1005–1013.
8. Léauté-Labrèze C., Dumas E., T. Hubiche et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358 (24): 2649–2651.
9. Püttgen K., Lucky A., Adams D. et al. Topical Timolol Maleate Treatment of Infantile Hemangiomas. *Pediatrics.* 2016;138 (3). doi: 10.1542/peds.2016-0355.
10. Дубенский Вл.В. Клинико-функциональные особенности ювенильных гемангиом. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии, косметологии. 2013; (8): 15-24.
11. Дубенский В.В., Дубенский В.В., Автомонова А.В. Клинико-функциональные показатели и особенности ведения детей с ювенильными гемангиомами. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014620009, от 09 января 2014г.
12. Дубенский В.В. Клинико-функциональные показатели поверхностных ювенильных гемангиом. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620204, от 10 февраля 2016г.
13. Дубенский В.В. Безопасность тимолола *in vitro*, в аспекте топической терапии ювенильных гемангиом. Тезисы научных работ XVI Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов. 2016; 9.

Сведения об авторах:

Дубенский Владислав Валерьевич – к.м.н., доцент, профессор кафедры дерматовенерологии с курсом дерматовенерологии и косметологии ФГОУ ВО Тверской ГМУ, 170100, Тверь, Советская, 4. тел. 8-910-930-03-30, e-mail: tgma.estet@yandex.ru – Автор ответственный за переписку с редакцией.

Поступила 15.11.2016 г.