

СЕРГЕЕВА Юлия Анатольевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
D-АСПАРАГИНА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ РЕЦИПИЕНТНОЙ ЗОНЫ К
ЛИПОФИЛИНГУ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России).

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Каде Азамат Халидович.

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Гайворонская Татьяна Владимировна.

Официальные оппоненты:

Михайличенко Вячеслав Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, кафедра общей хирургии, анестезиологии-реаниматологии и скорой медицинской помощи, заведующий кафедрой;

Зиновьев Евгений Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», отдел термических поражений, руководитель отдела.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 14 декабря 2021 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.014.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861) 2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте (<http://www.kσμα.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 21.2.014.02
доктор медицинских наук,
профессор



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Липофилинг является одним из перспективных методов коррекции рубцовых дефектов кожи различного происхождения (A. Condé-Green et al., 2016). Применение липофилинга для лечения рубцов способствует восстановлению структуры дермы и подкожной жировой клетчатки в зоне их локализации, за счет чего достигается улучшение эстетики кожи (V.L. Negenborn et al., 2016; M.E. Jaspers et al., 2017). По данным литературы, ключевая роль в позитивном влиянии липофилинга на ремоделирование рубцовой ткани принадлежит мезенхимальным стволовым клеткам жировой ткани (МСК ЖТ) (M. Klinger et al., 2013; M. Doornaert et al., 2019) и ими продуцируемым биологически активным веществам – HGF, PGE₂, IL-10, NO (B.F. Seo, S.N. Jung, 2016; C.R. Harrell et al., 2019). Применение МСК ЖТ в экспериментах как *in vitro*, *ex vivo*, так и *in vivo* способствует снижению отложения депозитов коллагена и подавляет формирование рубцовой ткани, за счет подавления p38/MAPK сигнального пути (Y. Li et al., 2016). МСК ЖТ угнетают продукцию TGF-1 β и IL-13, а также обусловленную данными цитокинами пролиферацию фибробластов и гиперпродукцию матрикса соединительной ткани на фоне повышения экспрессии матриксных металлопротеиназ (L. Wang et al., 2017; A.A. Voronikova et al., 2018; X. He et al., 2020). Несмотря на наличие множества работ подтверждающих позитивное влияние липофилинга при лечении кожных рубцов, существуют единичные исследования, в ходе которых не удалось доказать его эффективность (S. Gal, J.I. Ramirez, P. Maguina, 2017). Залогом успешного приживления липографта является достаточный уровень кровоснабжения реципиентной зоны (С.М. Oranges et al., 2018; С.М. Oranges et al., 2019). В случае липофилинга на рубцовой ткани, его относительно низкая эффективность лимитирована прежде всего недостаточным уровнем кровоснабжения, что обуславливает необходимость разработки новых способов подготовки реципиентной зоны (С.М. Oranges et al., 2018; С.М. Oranges et al., 2019; Ю.А. Сергеева и др., 2019).

Многообещающим способом подготовки реципиентной зоны с целью последующего применения липофилинга для лечения гипертрофических и келоидных рубцов может стать использование препаратов с антипролиферативной активностью, таких как, 5-фторурацил, митомицин С, блеомицин, метотрексат, глюкокортикоиды, интерфероны (В.И. Шаробаро и др., 2015; С.Д. Jones et al., 2015; E. Bijlard, S. Steltenpool, F.B. Niessen, 2015; I. Khansa, V. Harrison, J.E. Janis, 2016; V. Berman, A. Maderal, V. Raphael, 2017; Q.Q. Fang et al., 2017).

В отличие от вышеуказанных препаратов D-аспарагин, является естественным метаболитом в организме млекопитающих, при этом обладая антипролиферативной активностью, имеет более благоприятный профиль безопасности, что показывает потенциал данной молекулы в качестве основы для разработки нового класса противорубцовых препаратов (Ю.А. Сергеева и др., 2019).

Степень разработанности темы. К настоящему времени получено множество научных данных о различных аспектах метаболизма D-аспартата: пути поступления и синтеза в организме человека и млекопитающих, распределение во внутренних органах и тканях; открыты ферменты поддерживающие постоянство концентрации, разрывающие связь D-аспартата с т-РНК и осуществляющие превращение остатков D-аспартила и D-аспарагина, образовавшихся в ходе спонтанной рацемизации в составе белков, в L-формы. Активно изучается роль D-аспартата, и в значительно меньшей степени D-аспарагина, в функционировании нервной, эндокринной и иммунной систем, процессе фоторецепции, развитии головного мозга, зрительного анализатора и гонад. Идет накопление данных о роли D-аспартата в патогенезе разных заболеваний: получены сведения о генетических дефектах ферментов обмена, показано участие в развитии патологических процессов обусловленных старением, изучается роль D-аспартата и D-аспарагина в канцерогенезе. При этом в литературе отсутствуют данные о влиянии D-аспартата и D-аспарагина, на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека, а также практически не изучена их роль в патогенезе раневого процесса, регенерации тканей и образовании рубцов.

Цель исследования: изучить влияние D-аспарагина на пролиферативную активность первичной культуры дермальных фибробластов человека и разработать оптимальный способ его применения при подготовке реципиентной зоны для проведения липофилинга на рубцах.

Задачи исследования:

- 1) Провести гистологическое исследование кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца;
- 2) Провести морфометрию кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца;
- 3) Выполнить комплексное иммуногистохимическое исследование (на коллаген 1 типа, фактор фон Виллебранда, АРМАР, АIF-1, виментин) в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца;
- 4) Оценить влияние D-аспарагина на пролиферативную и метаболическую активность, а также морфологию дермальных фибробластов человека;
- 5) Разработать оптимальный способ применения D-аспарагина с целью подготовки реципиентной зоны для проведения липофилинга на рубцах.

Научная новизна.

Впервые:

показано, что использование D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга способствует снижению толщины эпидермиса и дермы, а также сопровождается восстановлением структуры кожи в зоне патологического кожного рубца;

показано, что использование D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга снижает степень резорбции, выраженность фиброза и хронического воспаления, повышает васкуляризацию в зоне введения липоаспирата;

показано, что D-аспарагин, при воздействии в течение 2-6 часов в концентрации 0,013 и 0,13 г/л стимулирует пролиферативную активность первичной культуры дермальных фибробластов человека;

показано, что в концентрации 0,013 и 0,13 г/л D-аспарагин, при 24-48 часовой экспозиции подавляет пролиферативную активность первичной культуры дермальных фибробластов человека. При этом антипролиферативное действие D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л при 24-48 часовой экспозиции приводит к значительному изменению морфологии дермальных фибробластов человека.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Полученные в проведенном исследовании результаты дополняют современные представления о биологической роли D-аминокислот в организме млекопитающих и человека, в части влияния D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека, течение раневого процесса, эпителизацию и ремоделирование раневых поверхностей. Учитывая результаты культуральной части исследования, становится очевидным, что помимо опосредованного через воздействие на глутаматные рецепторы, у D-аспартата и D-аспарагина могут быть и иные механизмы влияния на пролиферативную активность клеток. Так как, D-аспартат и D-аспарагин являются оптическими изомерами L-аспартата и L-аспарагина (протеиногенные аминокислоты), то не исключается их влияние на трансляцию белка, конкуренция за места связывания и ингибирование ферментов участвующих в обмене их L-форм, посттрансляционная модификация и изменение функционирования структурных белков, рецепторов, ферментов. Учитывая факт возможного влияния данных D-аминокислот на процессы трансляции, недавние открытия глутаматных рецепторов на периферии, а также интегративную роль нейроиммунноэндокринной регуляции и влияние на нее D-аспартата можно выдвинуть гипотезу о возможном наличии влияния D-аспартата и D-аспарагина на жизнедеятельность и, как следствие, пролиферативную активность практически всех типов соматических клеток млекопитающих. В связи с чем, представляет интерес изучение роли D-аспартата и D-аспарагина в патофизиологии раневого процесса. Анализ полученного материала может быть использован для продолжения научно обоснованного поиска новых противорубцовых средств, а также для улучшения результатов липофилинга в условиях его последующего применения для лечения повреждений с высоким риском развития фиброза.

Результатом работы стало патогенетическое обоснование способа подготовки реципиентной зоны, в случае повреждений с высоким риском фиброза, для последующего проведения липофилинга на рубцах.

Методология и методы исследования. Сбор и анализ результатов работы осуществлялась в соответствии с разработанной диссертантом схемой исследования, с использованием современных и адекватных поставленным задачам описательного, экспериментального, патоморфологического, культурального, биохимического и статистического методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Толщина эпидермиса, по результатам морфометрии зоны дермального рубца через 63 дня (2 месяца) после проведения липофилинга, при использовании D-аспарагина для подготовки реципиентной зоны на модели дермального рубца была на 44,4% ($p=0,000017$) меньше, чем в группе сравнения и на 28,57% ($p=0,0032$) меньше, чем в контрольной группе.

2. Толщина дермы, по результатам морфометрии зоны дермального рубца через 63 дня (2 месяца) после проведения липофилинга, при использовании D-аспарагина для подготовки реципиентной зоны на модели дермального рубца была на 23% ($p=0,000067$) меньше, чем в группе сравнения и на 5,9% ($p=0,0038$) меньше, чем при изолированном применении липофилинга в контрольной группе.

3. По данным иммуногистохимического исследования кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца установлено, что в опытной группе (с D-аспарагином), в сравнении с группами сравнения и контрольной, снижена экспрессия коллагена 1, виментина и AIF-1 и повышена экспрессия фактора фон Виллебранда и АРМАР. Это позволяет утверждать, что предварительная подготовка реципиентной зоны D-аспарагином повышает активность ангиогенеза и выживаемость липоаспирата, а также снижает выраженность фиброза и воспалительной реакции в зоне окружающей липографт.

4. D-аспарагин, при воздействии в течение 2-6 часов в концентрации 0,013 и 0,13 г/л, стимулирует пролиферативную активность культуры дермальных фибробластов человека. При 24-48 часовой экспозиции D-аспарагин подавляет пролиферативную активность первичной культуры дермальных фибробластов человека. При этом антипролиферативное действие D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л при 24-48 часовой экспозиции приводит к значительному изменению морфологии дермальных фибробластов человека, указывая на его выраженное токсическое действие при данном режиме применения.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством экспериментов и объемом собранного материала, а также использованием современных и информативных методов исследования и статистического анализа. Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: 2nd International Conference on Stem cell & Regenerative Medicine (2020, Орландо, США); Internal Medicine & Patient Care (2020, Лондон, Великобритания); XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (2021, Москва, РФ); 88-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых учёных и студентов с международным участием, посвященная 100-летию НОМУС им. И.И. Мечникова (2021, Иркутск, РФ).

Внедрение результатов исследования. Основные результаты исследования используются в научно-исследовательской и педагогической работе кафедры общей и клинической патологической физиологии, кафедры биологии с

курсом медицинской генетики, кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 6 – в изданиях, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе 2 патента.

Личный вклад автора в исследование. Диссертантом определены цели и задачи исследования (75%), разработан дизайн исследования (85%), выполнен поиск и подготовлен обзор отечественных и зарубежных источников научной литературы по теме диссертации (100%). Автором проведена экспериментальная часть работы на лабораторных животных (92%) и культуральные исследования (60%), выполнен сбор и подготовка биоматериала для лабораторного исследования (93%), статистическая обработка и анализ результатов исследования (94%). Автор принимал непосредственное участие в подготовке научных положений и выводов диссертации, предложений для внедрения, а также, в разработке практических рекомендаций (92%).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, включает 14 таблиц и 29 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы отражающей результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, содержащего 13 отечественных и 272 иностранных источников и 5 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных используемых для экспериментов или в иных научных целях (ред. Страсбург, 2006). Взятие кожи и жировой ткани у пациентов выполнено по медицинским показаниям, после получения добровольного информированного согласия на забор и использование биоматериала (в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА).

Характеристика групп животных (самцы крыс, n=60): группа 1 (контроль, n=20) – липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; группа 2 (сравнения, n=20) – то же, но с предварительным введением 0,9% хлорида натрия на 5 и 12-е сутки; группа 3 (опытная, n=20) – то же, но с предварительным введением 0,5% раствора D-аспарагина на 5 и 12-е сутки. На 42-е сутки эксперимента проводили липофилинг, а на 105-е сутки (через 2 месяца после липофилинга) – забор кожи в зоне рубца для гистологического и иммуногистохимического исследования. Вмешательства способные причинить боль животным проводили под наркозом – телазол 20 мг/кг в/м и ксиланит 6 мг/кг

в/м (А.М. Файн и др., 2019). Моделирование дермального рубца выполняли путем в/к введения 1 мл водного раствора содержащего 10% дезоксихолата натрия и 0,5% K_2 -ЭДТА (Ю.А. Сергеева и др., 2019).

Для получения липоасpirата и его обработки использовали метод S.R. Coleman & G.H. Carraway (S.R. Coleman, G.H. Carraway, 2002). Липофилинг проводили путем подкожного введения 1 мл жировой фракции в зоне кожного рубца крысы (V.D. Thanik et al., 2009).

На 105-е сутки эксперимента (спустя 2 месяца после липофилинга) проводили забор и фиксацию биоматериала. Изготавливали гистологические микропрепараты, их окраску выполняли по протоколу для гематоксилин-эозина (с гематоксилином Гарриса), а также по Маллори-Слинченко (Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров, 2010). Проведение иммуногистохимических исследований проводилось строго в соответствии с протоколами производителей наборов. Антиген визуализировали диаминобензидин тетрагидрохлоридом (ДАВ-хромоген), с помощью стрептавидин-биотиновой системы детекции. Микропрепараты фотографировали с помощью окулярной камеры «Levenhuk M300 base» (США) на микроскопе Микромед-6 (Россия), фотографии сохраняли в формате TIFF. Для анализа изображений применяли программу «Image J 1.51j8» (National Institute of Health, США). Оценку содержания коллагена проводили на микропрепаратах окрашенных по Маллори-Слинченко (J.H. Hong et al., 2020). Для оценки результатов иммуногистохимических исследований, после проведения деконволюции изображений с использованием плагина `color_deconvolution2.jar` (вектор для срезов с окрашиванием гематоксилин и ДАВ-хромоген), проводили подбор порога чувствительности. Содержание коллагена 1 типа и виментина в краевой зоне липографта и дерме (центр и периферия рубца) оценивали как процентное соотношение площади выделенных структур по отношению к площади поля зрения. Подсчет объектов окрашенных на АIF-1 (клетки) и АРМАР (клетки) проводили автоматически с помощью инструмента анализ частиц в пересчете на 1 мм^2 , а структуры окрашенных на vWF (капилляры) определяли полуавтоматическим способом в расчете на 1 п.з. с помощью плагина `cell_counter.jar` (С.У. Ngan et al., 2007; А.Р. Crowe, W. Yue, 2019). Определение толщины эпидермиса и дермы проводили на микропрепаратах окрашенных гематоксилин-эозином, по 10 точкам измерения в центральной зоне рубца (Н. Khorasani et al., 2011). На окрашенных гематоксилин-эозином микропрепаратах кожи в зоне рубца, по шкале от 0 до 5 баллов (С. Yi et al., 2006; S.J. Hong et al., 2010) оценивали: сохранность адипоцитов; наличие кист; выраженность фиброза и воспаления.

Культуральная часть исследования: культивирование дермальных фибробластов человека на среде с D-аспарагином в концентрации 0,013 и 0,13 г/л в течение 2, 6, 24 и 48 часов. Первичная культура дермальных фибробластов человека выделена путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки кожных лоскутов (А. Takashima, 1998; В.Л. Зорин и др., 2014). Культуральная часть работы проводилась в CO_2 -инкубаторе (BINDER

BF56) в стандартных условиях (при 37⁰С, 5%CO₂ и 100% влажности). Первичная культура дермальных фибробластов пассирована до 3-го пассажа, с использованием стандартной питательной среды, состоящей из раствора ДМЕМ (Gibco), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% (по объему) раствора антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific). После окончания 72-часового цикла культивирования выполнено: определение пролиферативной активности, ХТТ-тест, цитологическое и иммуноцитохимическое исследования, а также кариотипирование. Для каждого исследования выполнено 3 серии экспериментов. Пролиферативную активность оценивали по среднему времени удвоения популяции фибробластов (А. Korzynska, М. Zychowicz, 2008; Ф.А. Фадеев и др., 2016). Метаболическую активность клеток оценивали согласно протоколу производителя, колориметрическим методом с использованием соли тетразолия ХТТ (AppliChem, США) (М.В. Супотницкий и др., 2015). Цитологические микропрепараты окрашивали по Романовскому-Гимзе. Иммуноцитохимические исследования на виментин, p53 и Ki-67 проводили на цитологических микропрепаратах непрямым пероксидазным методом, антиген визуализировали DAB-хромогеном. Экспрессия белка Ki-67 и виментина оценивалась по полуколичественной шкале (от 0 до 4-х баллов), а к белку p-53 качественным методом.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения «MS Excel 2010» (Microsoft, США), GraphPadPrism 7 (GraphPad Company, США) и «Statistica 13» (StatSoft Inc, США). Описательную статистику исследуемых величин проводили с использованием следующих показателей: среднее арифметическое, доверительные интервалы для среднего арифметического (\pm ДИ 95%), стандартное отклонение и стандартная ошибка среднего. Для изучения взаимосвязи между временем экспозиции и пролиферативной активностью фибробластов использовали коэффициент корреляции Спирмена, значение r оценивали по шкале Чеддока. С целью оценки наличия межгрупповых различий при сравнении трех групп по исследуемому показателю применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), при $F > F_{\text{крит}}$ с $p < 0,05$ отклоняли нулевую гипотезу об отсутствии эффекта вмешательства. Определение межгрупповых различий при попарном сравнении групп проводили с помощью post-hoc тестов Тьюки и Даннета (S. Lee, D.K. Lee, 2018). Уровнем статистической значимости, при котором принималась альтернативная гипотеза во всех случаях считали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что между продолжительностью экспозиции дермальных фибробластов человека (P3) в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,013 и 0,13 г/л и их пролиферативной активностью существует обратно пропорциональная зависимость (рисунок 1). Полученные данные вызывают большой интерес в связи с тем, что D-аспартат и D-аспарагин выявляются в коже грызунов и человека в свободном состоянии и в составе белков (Y. Xing, X. Li, X. Guo, Y. Cui, 2016; N. Fujii et al., 2018; V.V. Dyakin, T.M.

Wisniewski, A. Lajtha, 2021). Так в группах 1 и 5 (2 часа), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 17,22% и 6,96% ($p_{1-к}=0,024$; $p_{5-к}=0,0112$), учитывая то, что динамика данного показателя отражает логарифмическую зависимость, полученные данные свидетельствуют о крайне высокой пролиферативной активности клеток (рисунок 1). В группах 4 и 8 (48 часов), в сравнении с контролем, напротив, отмечено прогрессирующее увеличение времени удвоения популяции фибробластов на 37,16% и 16,46% ($p_{4-к}=0,0002$; $p_{8-к}=0,0001$), что указывает на крайнюю степень угнетения пролиферативной активности (рисунок 1). При этом в группах 2, 6 (6 часов) и 3, 7 (12 часов), по мере роста времени экспозиции отмечается плавное уменьшение пролиферативной активности клеток, по данному показателю статистически значимых различий с контролем не получено ($p>0,05$) (рисунок 1).

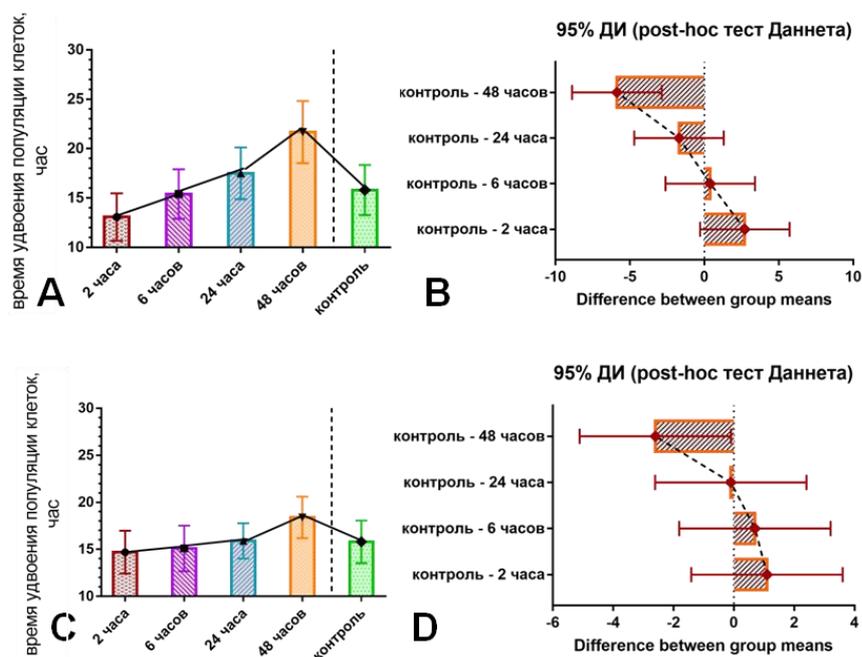


Рисунок 1 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, В) и 0,13 г/л (С, D) на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета)

Полученные выводы подтверждаются тем, что при расчете коэффициента корреляции Спирмена $r=-1,0$, значение r по шкале Чеддока характеризует связь между исследуемыми признаками как очень тесную, зависимость признаков статистически значима ($p<0,05$). Учитывая результаты культуральной части исследования (D-аспарагин при 2-6 часовом воздействии стимулирует, а при 24-48 часовом, напротив, подавляет пролиферативную активность) можно сделать предположение, что у D-аспарагина имеется как минимум два механизма влияния на пролиферацию дермальных фибробластов человека *in vitro*.

Стимуляция пролиферации дермальных фибробластов человека вероятно достигается за счет воздействия на глутаматные рецепторы, что косвенно подтверждается данными о том, что NMDA-рецепция повышает пролиферацию опухолевых клеток (W.G. North et al., 2010; A.D. Hogan-Cann, C.M. Anderson,

2016) и первичной культуры кератиноцитов ротовой полости человека (I.S. Kim et al., 2006; I.S. Kim et al., 2007).

Наблюдаемое подавление пролиферации фибробластов предположительно обусловлено антиметаболическим действием D-аспарагина, о чем косвенно свидетельствует прогрессирующее снижение их пролиферации по мере роста времени экспозиции и концентрации данной D-аминокислоты. Н.И. Чалисова, А.Е. Коровин показывают, что воздействие D-аспартата и D-аспарагина в эффективной концентрации 0,05 нг/мл в течение 3-х суток сопровождалось снижением индекса пролиферации клеток эксплантов кожи крысы по отношению к контролю. Однако авторы указывают на статистическую недостоверность ($p > 0,05$) выявленных изменений (Н.И. Чалисова, А.Е. Коровин, 2017), что вероятно обусловлено использованием эксплантов кожи, а не дермальных фибробластов (P3). При длительном культивировании (14-21 день) изолированного семенника мыши экзогенный D-аспартат подавляет дифференцировку зародышевых клеток за счет уменьшения количества митотических и мейотических клеток (К. Tomita et al., 2016). В экспериментах с трансплантацией опухолей крыс, воздействие D-аспартата в суточной дозировке 1000 мг/кг в течение 214 дней приводит к ингибированию опухолевого роста на 88% (В. Szende, 1993).

Механизмы антиметаболического влияния D-аспарагина и D-аспартата на пролиферативную активность клеток могут быть обусловлены тем, что данные D-аминокислоты являются оптическими изомерами L-аспартата и L-аспарагина (протеиногенные аминокислоты). В связи с чем не исключается их влияние на трансляцию белка (G. Zheng et al., 2009; T. Fujino et al., 2013; M.T. Englander et al., 2015), посттрансляционная модификация и изменение функционирования белков (Т. Furuchi et al., 2010; I. Sambri et al., 2011; M. Yamashita et al., 2018; V.V. Dyakin, Т.М. Wisniewski, А. Lajtha, 2021) и конкуренция за места связывания и ингибирование ферментов участвующих в обмене их L-форм, на что указывает ключевая роль L-аспарагина для поддержания пролиферации нормальных (С.Л. Lomelino, J.T. Andring, R. McKenna, M.S. Kilberg, 2017) и опухолевых клеток (J. Zhang et al., 2014; S. Hettmer et al., 2015; A.S. Krall et al., 2016; J. Jiang et al., 2018; L.B. Sullivan et al., 2018; G. Pathria et al., 2019; A.S. Krall et al., 2021).

Принимая во внимание данные литературы и полученные результаты можно выдвинуть гипотезу о возможном влиянии D-аспартата и D-аспарагина на жизнедеятельность и пролиферацию соматических клеток млекопитающих.

По результатам ХТТ-теста выявлены различия в метаболической активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени экспозиции и исследуемой концентрации D-аспарагина (рисунок 2). По мере увеличения продолжительности экспозиции дермальных фибробластов человека в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,013 и 0,13 г/л наблюдается тенденция к росту их метаболической активности, в сравнении с контролем, более выраженная в отношении групп 5-8 (0,13 г/л D-аспарагина) (рисунок 2). Полученные выводы подтверждаются тем, что при расчете

коэффициента корреляции Спирмена $r=0,8$, значение r по шкале Чеддока характеризует связь между исследуемыми признаками как тесную, зависимость признаков статистически значима ($p<0,05$). Выявленное противоречие между пролиферативной активностью и данными ХТТ-теста (рост метаболической активности на фоне увеличения времени удвоения клеточной популяции) объясняется тем, что по мере роста времени экспозиции и концентрации D-аспарагина в питательной среде активируется механизм окислительного дезаминирования D-аминокислот (DDO, Daao), что приводит к ложному завышению результатов ХТТ-теста за счет активации FAD-зависимого пути образования формазана (L. Śliwka et al., 2016; S. Sacchi et al., 2018).

При анализе данных цитологического и иммуноцитохимических исследований фибробластов (рисунок 3) подтверждаются результаты, полученные при оценке времени удвоения популяции дермальных фибробластов человека (рисунок 1). Согласно данным цитологического исследования прослеживается, что по мере роста времени экспозиции в среде с D-аспарагином снижается число митотически активных клеток, что ясно свидетельствует о снижении их пролиферативной активности. Полученные результаты находят подтверждение при оценке пролиферативного индекса, определенного по экспрессии маркера пролиферации клеток Ki-67 (X. Sun, P.D. Kaufman, 2018). В показавших, по данным ХТТ-теста, наиболее высокий уровень метаболической активности группах (рисунок 2) определяется наименьший уровень экспрессии маркера пролиферации клеток Ki-67, так в группах 4 и 8 наблюдается его падение на 42,50% и 66,25%, до 2,3 и 1,35 баллов ($p_{4-к}<0,00001$; $p_{8-к}<0,00001$) (рисунок 3).

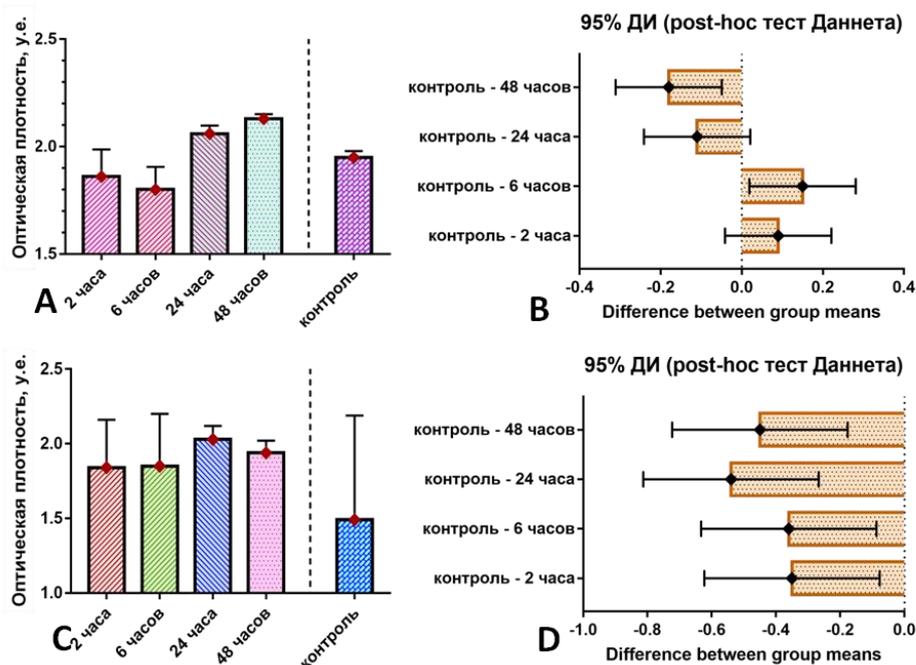


Рисунок 2 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, В) и 0,13 г/л (С, D) на метаболическую активность дермальных фибробластов человека, (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета)

При цитологическом исследовании фибробластов, подвергнутых инкубации в среде с 0,13 г/л D-аспарагина – группы 5-8, по мере роста времени экспозиции, на фоне снижения пролиферативной активности, значительно нарастает количество атипичных клеток. Учитывая факт изменения морфологии фибробластов по мере роста времени экспозиции в питательной среде с концентрацией D-аспарагина 0,13 г/л в группах 7 и 8, можно поставить вопрос об онкогенном перерождении клеток. В пользу данного предположения указывают данные показывающие, что клетки рака молочной железы человека (линия *MCF-7*) содержат в 22 раза больше D-аспаратата, чем неканцерогенные эпителиальные клетки молочной железы (линия *MCF-10A*) (S. Du et al., 2019). Уровень D-аспарагина был также выше в опухолевых клетках (линия *MCF-7*), но разница с нормой выражена в меньшей степени по сравнению с D-аспарагатом (S. Du et al., 2019). Накопление D-аспаратата за счет спонтанной рацемизации в кожных покровах ассоциировано со старением (S. Ritz-Timme et al., 2003; Y. Mori et al., 2011; N. Fujii et al., 2018). Однако ни в одной из групп, как и в контроле не было обнаружено признаков ядерной экспрессии белка p53, что в целом свидетельствует против данной гипотезы (T. Lin et al., 2019). Показана экспрессия сходных уровней мРНК и белка p53 как для фибробластов с низким количеством пассажей (молодые), так и с высоким количеством пассажей (старые), при этом транскрипционная активность p53 увеличена в несколько раз в стареющих клетках (P. Atadja et al., 1995). Молекулярные изменения, связанные со старением клеток линии диплоидных фибробластов человека *IMR-90* ассоциированы с ростом содержания белка p53 в клетках (K.S. Kulju, J.M. Lehman, 1995).

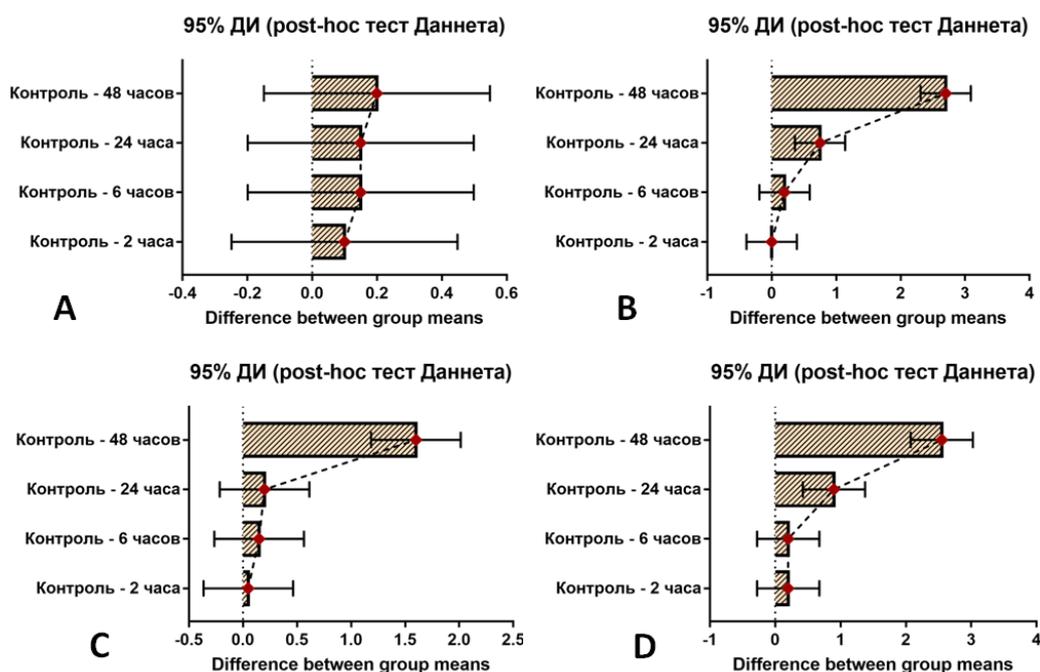


Рисунок 3 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, С) и 0,13 г/л (В, D) на экспрессию виментина (А, В) и Ki-67 (С, D) дермальными фибробластами человека (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета). Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67 и виментин оценивалась полуколичественно (от 0 до 4 баллов)

Представляет интерес, что при онкогенной трансформации происходит повышение экспрессии виментина (E. Terriac et al., 2017). По данным проведенного иммуноцитохимического исследования, в группах 7-8, напротив, показана нарастающая тенденция к падению экспрессии виментина ($p_{7-к} < 0,00001$; $p_{8-к} < 0,00001$), сопровождающаяся исчезновением характерной для фибробластов морфологии (рисунок 3). В группах 1-4 по уровню экспрессии виментина, статистически значимых различий в отношении контроля не выявлено ($p_{1-к} = 0,389$; $p_{2-к} = 0,222$; $p_{3-к} = 0,222$; $p_{4-к} = 0,176$; соответственно) (рисунок 3).

Полученные данные указывают на явное токсическое воздействие D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на дермальные фибробласты человека, при этом отсутствие на микропрепаратах признаков ядерной экспрессии белка p53 и отсутствие хромосомных aberrаций может являться свидетельством того, что выявленные проявления клеточного атипизма не являются признаками онкогенного перерождения клеток.

Результаты культуральной части исследования показывающие влияние D-аспарагина на пролиферативную активность фибробластов согласуются с данными полученными *in vivo*. В основной группе (применение D-аспарагина) продолжительность периода до наступления полной эпителизации раневого дефекта образовавшегося при моделировании дермального рубца была на 29,3% и 28,5% больше, чем в группах контроля и сравнения (*post-hoc* тест Тьюки, $p < 0,00001$) (рисунок 4).

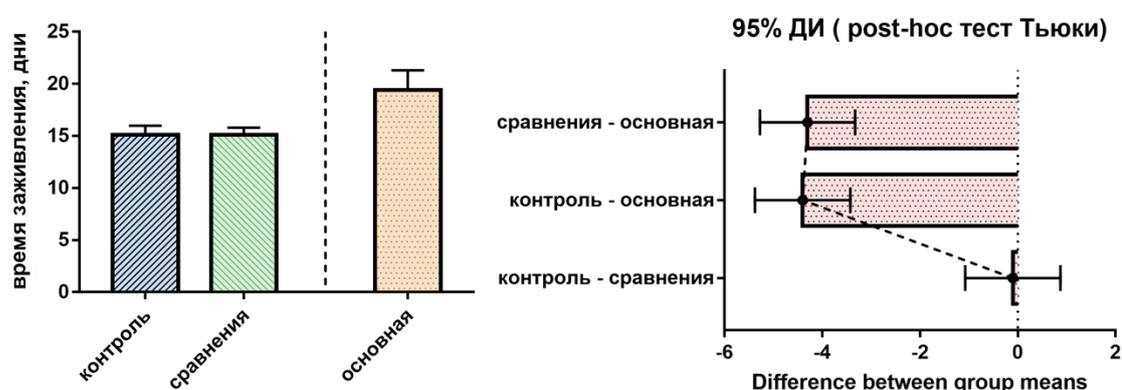


Рисунок 4 – Продолжительность периода до наступления полной эпителизации раневого дефекта при моделировании дермального рубца (one-way ANOVA, *post-hoc* тест Тьюки)

Применение D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны сопровождается снижением толщины эпидермиса и дермы ($p < 0,05$) в центральной зоне патологического кожного рубца крыс основной группы (рисунок 5). Отмеченная тенденция может быть обусловлена некоторым замедлением пролиферативной активности клеток под влиянием D-аспарагина в пролиферативную стадию раневого процесса. В пользу данной гипотезы свидетельствует тот факт, что *in vitro* D-аспарагин при 48-часовой инкубации вызывает снижение пролиферативной активности дермальных фибробластов. Полученные результаты согласуются с данными W.K. Nahm и соавт. о

ингибировании процесса реэпителизации при повреждении кожных покровов под влиянием роста экспрессии рецепторов NMDA-рецепторов (GluN1; GluN2A,B подтипы) в кератиноцитах (W.K. Nahm et al., 2004).

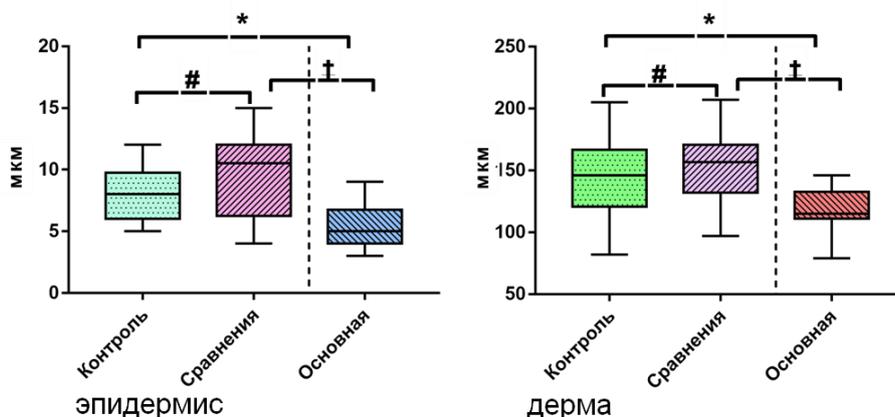


Рисунок 5 – Толщина эпидермиса и дермы через 2 месяца после проведения липофилинга; * и † – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об отсутствии (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки)

Предположительно, NMDA-рецепция влияет на цикл пролиферации, дифференцировки и миграции кератиноцитов во время эпителизации. Активация NMDA-рецептора может играть важную роль в контакт-опосредованном ингибировании роста кератиноцитов. Показательно, что при этом клетки плоскоклеточного рака кожи лишены NMDA-рецепторов (W.K. Nahm et al., 2004).

При оценке морфологии липографта выявлены межгрупповые различия ($p < 0,05$) в сохранности адипоцитов, наличии кист и вакуолей, выраженности фиброза и воспаления, отражающие лучшее состояние трансплантированной жировой ткани в основной группе с предварительной подготовкой реципиентной зоны D-аспарагином (рисунок 6).

Анализ микропрепаратов окрашенных по Маллори-Слинченко (рисунок 7) благодаря восприимчивости коллагена к красителю анилиновому синему, позволяет более точно оценить содержание коллагеновых волокон в дерме и липографте, в сравнении с окрашенными гематоксилин-эозином обзорными микропрепаратами. Ранее продемонстрирована первостепенная роль NMDA-рецепторов в сохранении нормального эпителиального фенотипа клеток проксимальных канальцев почек и подавлении TGF-1 β индуцированного почечного фиброза (M. Vozic et al., 2011). С другой стороны, стимуляция NMDA-рецепторов мезенхимальных стволовых клеток костно-мозгового происхождения отменяет их терапевтические эффекты на блеомициновой модели пневмофиброза у мышей, усугубляет тяжесть патологии, в том числе за счет индукции выработки TGF-1 β (X. Li et al., 2018). Также показано, что активация NMDA-рецепторов, за счет влияния на пролиферацию и дифференцировку фибробластов легких, потенцирует развитие вызванного гипероксией хронического повреждения легких у новорожденных крыс (Y. Wang et al., 2016).

В краевой зоне липографта, в дерме как центральной, так и краевой зоны рубца существуют статистически значимые ($p < 0,05$) межгрупповые различия,

показывающие более низкое содержание коллагена в основной группе (подготовка реципиентной зоны D-аспарагином), в отношении групп сравнения и контроля (рисунок 7). Полученные результаты помогают разрешить накопившиеся в литературе противоречия в отношении влияния D-аспарагина и D-аспартата на процессы ремоделирования эпителиальных тканей.

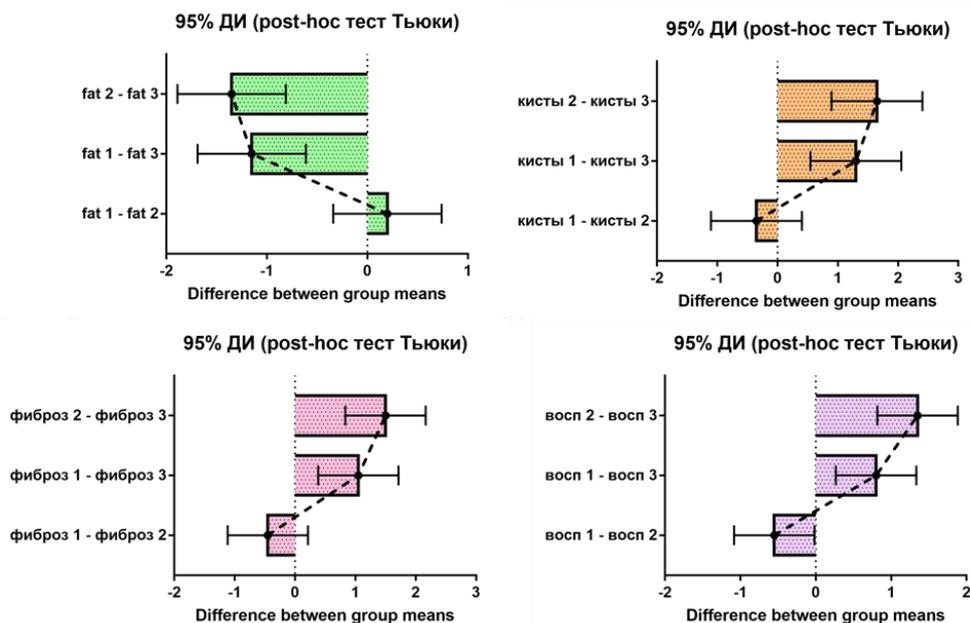


Рисунок 6 – Гистологическая оценка состояния липографта спустя 2 месяца после проведения липофилинга, полуколичественная оценка по шкале от 0 до 5 баллов, окраска гематоксилин-эозин (one-way ANOVA, post-hoc анализ Тьюки)

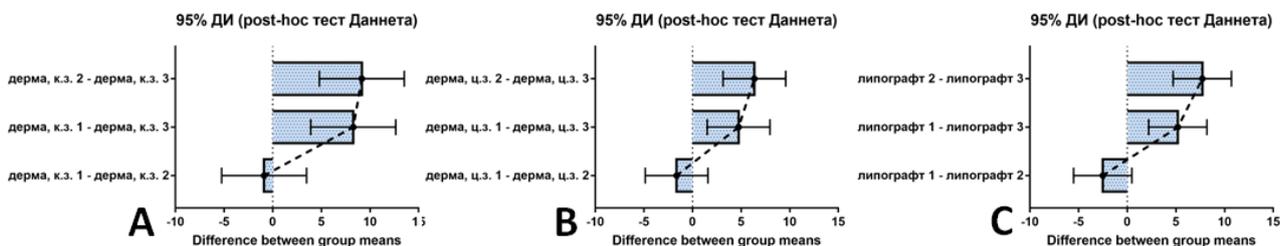


Рисунок 7 – Гистоморфометрический анализ содержания коллагеновых волокон через 2 месяца после проведения липофилинга, в % на п.з. (окраска по Маллори-Слинченко): А – дерма краевой зоны и В – дерма центральной зоны кожного рубца; С – краевая зона липографта (one-way ANOVA, post-hoc анализ Даннета)

С целью более детальной характеристики влияния исследуемого способа подготовки реципиентной зоны на состояние дермы и липографта в области кожного рубца выполнено иммуногистохимическое исследование на: коллаген 1 типа (рисунок 8 А, В), виментин (рисунок 8 С, D), AIF-1 (рисунок 9), vWF (рисунок 9) и АРМАР (рисунок 10). В основной группе содержание коллагена 1 типа в краевой зоне липографта на 18,64% и 29,87% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,377$; $p_{1-3}=0,269$; $p_{2-3}=0,014$). В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание коллагена на 12,41% и 11,58% меньше, чем в отношении групп контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,971$; $p_{1-3}=0,0093$; $p_{2-3}=0,017$). Полученные по данным иммуногистохимического исследования

результаты по экспрессии коллагена 1 типа в краевой зоне липографта и в дерме центральной зоны рубца, подтверждают выводы гистоморфометрического анализа окрашенных по Маллори-Слинченко микропрепаратов (рисунок 7).

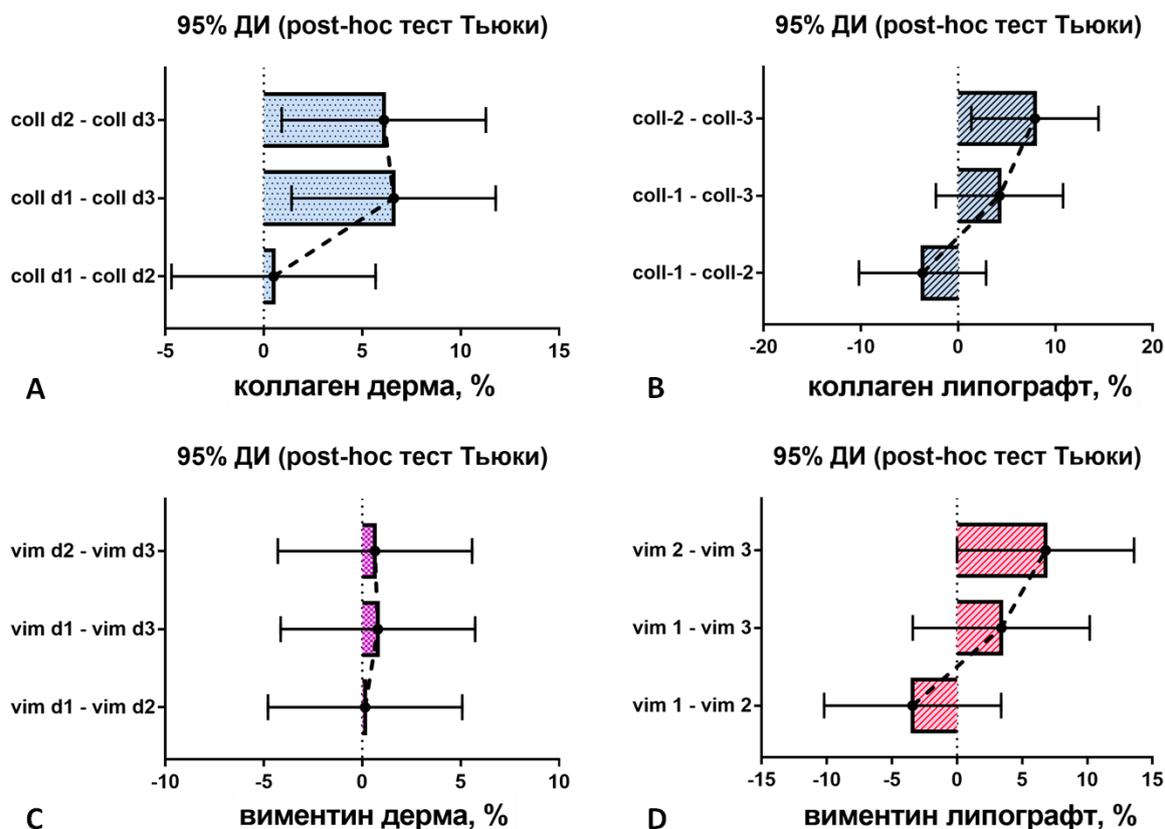


Рисунок 8 – Иммуногистохимическое исследование содержания коллагена 1 типа и виментина в зоне дермального рубца через 2 месяца после проведения липофилинга, дерма (А,С) и липографт (В,Д) (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки)

Повышение экспрессии виментина ассоциировано с эпителиально-мезенхимальным переходом, играющим важную роль в патогенезе гипертрофических и келоидных рубцов (F.L. Yuan et al., 2019). При анализе содержания виментина в краевой зоне липографта выявлено, что в основной группе на 12,85% и 22,78% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,455$; $p_{1-3}=0,456$; $p_{2-3}=0,0495$) (рисунок 8 D). В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, в основной группе содержание виментина на 3,35% и 2,74% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,997$; $p_{1-3}=0,919$; $p_{2-3}=0,946$) (рисунок 8 С). В связи с особенностями ориентации соединительнотканых волокон, в основной группе может определяться некоторое завышение уровня коллагена 1 типа и виментина, так как их содержание определялось как процент площади окрашивания занимаемой ДАВ-хромогеном, по отношению к площади поля зрения. В случае липофилинга на рубцовой ткани, его относительно низкая эффективность лимитирована прежде всего недостаточным уровнем кровоснабжения (С.М. Oranges et al., 2018; С.М. Oranges et al., 2019; Ю.А. Сергеева и др., 2019). Показано, что содержание vWF (капилляров) в

краевой зоне липографта в основной группе на 77,94% и 63,51% больше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,7240$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,0001$) (рисунок 9).

В связи с применением ксеногенной трансплантации липоаспирата (от человека крысе) оценка воспаления приобретает особую важность. Практически на всех микропрепаратах в краевой зоне липографта выявлены признаки лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации, при этом в основной группе показатель на 30,51% и 39,71% меньше, чем в отношении групп сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,055$; $p_{1-3}=0,00018$; $p_{2-3}=0,00001$) (рисунок 6).

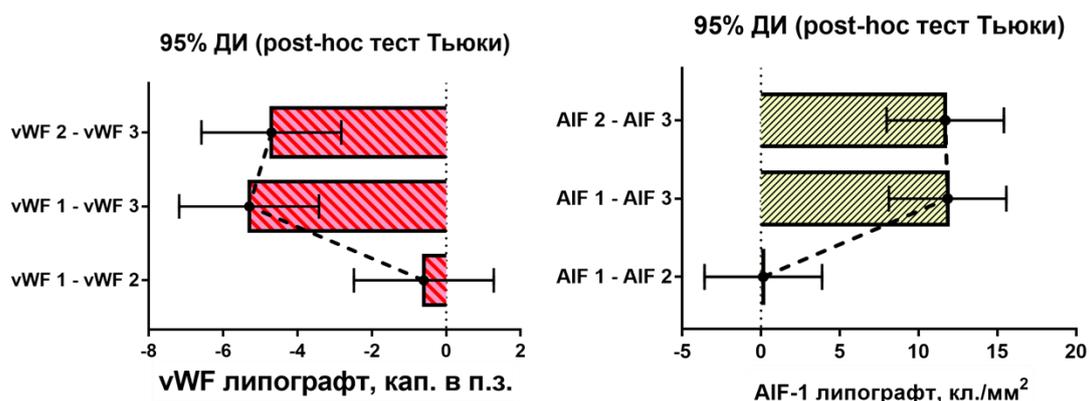


Рисунок 9 – Иммуногистохимическое исследование содержания vWF и AIF-1 в краевой зоне липографта через 2 месяца после проведения липофилинга (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки)

Результаты подтверждаются тем, что в основной группе содержание AIF-1 в краевой зоне липографта на 50,32% и 50% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,995$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,0001$) (рисунок 9). AIF-1 представляет собой цитоплазматический кальций-связывающий белок, который в основном экспрессируется в клетках иммунной системы. Показана важная роль AIF-1 в патогенезе отторжения аллотрансплантата и аутоиммунных заболеваний (Y.Y. Zhao, D.J. Yan, Z.W. Chen, 2013). Снижение экспрессии AIF-1 ассоциировано с лучшим прогнозом в заживлении кожных ран и уменьшением рубцеобразования (G. Zhao et al., 2020).

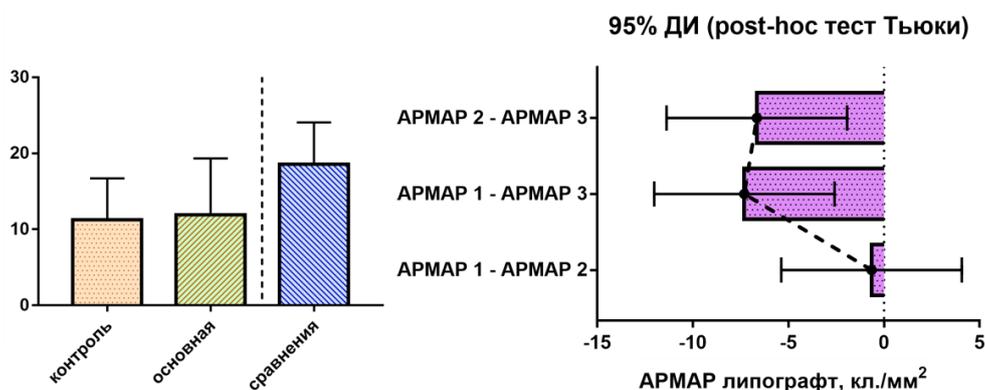


Рисунок 10 – Иммуногистохимическое исследование содержания ARMAP в краевой зоне липографта через 2 месяца после проведения липофилинга (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки)

Полученные результаты указывают, что инъецированный жир в целом приживается на выбранной модели (C.S. Lin, G. Lin, T.F. Lue, 2012) с легкими/умеренными признаками реакции отторжения. При оценке сохранности адипоцитов выявлено, что в основной группе показатель на 50% и 64,29% выше, чем группе сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,388$; $p_{1-3}=0,000038$; $p_{2-3}=0,00001$) (рисунок 6). В пользу полученных данных свидетельствует то, что в краевой зоне липографта основной группы уровень АРМАР (маркер метаболически активных адипоцитов) на 64,89% и 55,88% больше, чем группе контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,941$; $p_{1-3}=0,0013$; $p_{2-3}=0,0036$) (рисунок 10). Таким образом, подготовка реципиентной зоны D-аспарагином повышает активность ангиогенеза и выживаемость липоаспирата, снижает выраженность фиброза и воспалительной реакции в зоне окружающей липографт, а также потенцирует регресс дермального рубца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты дополняют современные представления о биологической роли D-аминокислот в организме млекопитающих и человека, в части влияния D-аспарагина на пролиферацию дермальных фибробластов, течение раневого процесса, эпителизацию, ремоделирование раневых поверхностей, рубцеобразование. Учитывая результаты культуральной части исследования, можно предположить, что помимо опосредованного через глутаматные рецепторы у D-аспарагина могут быть и иные механизмы влияния на пролиферацию клеток. Так как, D-аспартат и D-аспарагин являются оптическими изомерами L-аспартата и L-аспарагина (протеиногенные аминокислоты), то не исключается их влияние на трансляцию белка, конкуренция за места связывания и ингибирование ферментов участвующих в обмене их L-форм, посттрансляционная модификация и изменение функционирования белков. Принимая во внимание факт влияния данных D-аминокислот на процессы трансляции, недавние открытия глутаматных рецепторов на периферии, а также интегративную роль нейроиммунноэндокринной регуляции можно выдвинуть гипотезу о возможном наличии влияния D-аспартата и D-аспарагина на жизнедеятельность и, как следствие, пролиферацию практически соматических клеток млекопитающих. В связи с чем, представляет интерес дальнейшее изучение их роли в патофизиологии раневого процесса и рубцеобразования.

ВЫВОДЫ

1. По результатам морфометрии зоны дермального рубца толщина эпидермиса на 63-сутки (2 месяца) от проведения липофилинга, в основной группе меньше на 44,4% ($p_{2-3}=0,000017$) и 28,57% ($p_{1-3}=0,0032$), а толщина дермы меньше на 23% ($p_{2-3}=0,000067$) и 5,9% ($p_{1-3}=0,0038$), чем в группах сравнения и контроля.

2. По результатам гистоморфометрического исследования кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца на 63 сутки (2 месяца) от

введения липоасpirата установлено, что в опытной группе (с D-аспарагином) содержание коллагена меньше: в дерме краевой зоны на 9,94% ($p_{1-3}=0,00015$) и 10,88% ($p_{2-3}=0,000006$); в дерме центральной зоны рубца на 5,49% ($p_{1-3}=0,0016$) и 6,2% ($p_{2-3}=0,000065$); в краевой зоне липографта на 14,07% ($p_{1-3}=0,00013$) и 18,59% ($p_{2-3}=0,00001$), чем в группах сравнения и контроля, соответственно.

3. По результатам гистологического исследования кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца на 63 сутки (2 месяца) от введения липоасpirата установлено, что в опытной группе (с D-аспарагином): сохранность адипоцитов выше на 50% ($p_{1-3}=0,000038$) и 64,29% ($p_{2-3}=0,00001$); содержание кист меньше на 40,63% ($p_{1-3}=0,000053$) и 46,48% ($p_{2-3}=0,000017$); фиброз меньше на 31,82% ($p_{1-3}=0,0012$) и 40% ($p_{2-3}=0,00001$), признаки воспаления меньше на 30,51% ($p_{1-3}=0,00018$) и 39,71% ($p_{2-3}=0,00001$), чем в группах сравнения и контроля. Таким образом, предварительная подготовка реципиентной зоны D-аспарагином повышает сохранность липоасpirата, снижает выраженность воспалительной реакции и фиброза в зоне окружающей липографт, а также потенцирует регресс дермального рубца.

4. По данным иммуногистохимического исследования кожи в зоне проведения липофилинга на модели дермального рубца на 63 сутки (2 месяца) от введения липоасpirата установлено, что в основной группе уровень экспрессии: коллагена 1 типа в краевой зоне липографта меньше на 18,64% ($p_{1-3}=0,269$) и 29,87% ($p_{2-3}=0,014$) и в дерме центральной зоны рубца также меньше на 12,41% ($p_{1-3}=0,0093$) и 11,58% ($p_{2-3}=0,017$); виментина в краевой зоне липографта меньше на 12,85% ($p_{1-3}=0,456$) и 22,78% ($p_{2-3}=0,0495$) и в дерме центральной зоны рубца практически без изменений ($p>0,05$); vWF (капилляров) в краевой зоне липографта выше на 77,94% ($p_{1-3}=0,0001$) и 63,51% ($p_{2-3}=0,0001$); AIF-1 в краевой зоне липографта меньше на 50,32% ($p_{1-3}=0,0001$) и 50% ($p_{2-3}=0,0001$); ARMAP в краевой зоне липографта выше на 64,89% ($p_{1-3}=0,0013$) и 55,88% ($p_{2-3}=0,0036$), чем в группах контроля и сравнения. Таким образом, предварительная подготовка реципиентной зоны D-аспарагином повышает активность ангиогенеза и сохранность липоасpirата, снижает выраженность фиброза и воспалительной реакции в зоне окружающей липографт, а также потенцирует регресс дермального рубца.

5. D-аспарагин, при воздействии в течение 2-6 часов в концентрации 0,013 и 0,13 г/л, стимулирует пролиферативную активность дермальных фибробластов человека. При 24-48 часовом воздействии антипролиферативное действие D-аспарагина, в концентрации 0,13 г/л, особенно при времени инкубации 48 часов, сопряжено с выраженным изменением морфологии клеток. Это свидетельствует о его выраженном токсическом воздействии при данном режиме кондиционирования.

6. Эффективным способом подготовки реципиентной зоны, в случае повреждений с высоким риском фиброза, для последующего проведения липофилинга на рубцах является использование 0,5% водного раствора D-аспарагина на 5-е и 12-е сутки от начала раневого процесса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для проведения скрининга противорубцовых свойств химических веществ, лекарственных препаратов и композиций возможно использовать модель патологического кожного рубца у крыс, воспроизводимую с помощью внутрикожной инъекции водного раствора дезоксихолата натрия и K_2 -ЭДТА.

2. В случае необходимости оценки пролиферативной и метаболической активности клеточных культур млекопитающих на фоне применения D-аминокислот не рекомендуется использование тетразолиевых методов.

3. Рекомендовать дальнейшее изучение влияния D-аспарагина на патофизиологию раневого процесса, в контексте подготовки реципиентных зон при наличии повреждений с высоким риском образования патологических рубцов к проведению оперативных вмешательств.

4. Рекомендовать проведение доклинических испытаний способа подготовки тканей перед выполнением липофилинга применением D-аспарагина в качестве метода лечения гипертрофических и келоидных кожных рубцов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшее изучение роли D-аспарагина и D-аспартата в патофизиологии раневого процесса и рубцеобразования.

2. Продолжение научно-обоснованного поиска новых противорубцовых средств на основе соединений D-аспарагина и D-аспартата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

***1. Влияние D-аспарагина на формирование глиального рубца при остром повреждении спинного мозга в эксперименте у крыс / Ю.А. Сергеева, А.Х. Каде, А.И. Трофименко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017, № 3. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26420> (дата обращения: 21.06.2021).**

***2. Липофилинг. Обзор методики. Современные возможности и перспективы коррекции кожных рубцов / Ю.А. Сергеева, А.Х. Каде, С.Б. Богданов, А.И. Трофименко. – DOI: 10.35401/2500-0268-2019-15-3-62-67 // Инновационная медицина Кубани. – 2019. – Т. 15, № 3. – С. 62-67.**

***3. Повышение эффективности липофилинга при лечении экспериментальных рубцов кожи с помощью D-аспарагина / Ю.А. Сергеева, А.Х. Каде, Т.В. Гайворонская [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 41-47.**

*****4. Патент № 2691647 Российская Федерация, С1 А61К 31/198, А61К 47/30; А61Р 17/02. Средство для профилактики образования патологических кожных рубцов : № 2018142203 : заявл. 29.11.2018 : опубл. 17.06.2019 / Трофименко А.И., Гилевич И.В., Каде А.Х., Цуров А.Б., Богданов С.Б., Кузьмина Е.А., Зиннатуллина Д.И., Пономаренко Т.В., Сергеева Ю.А., Липатова А.С. – Бюл. № 17. – 13 с.**

*****5. Патент № 2710718 Российская Федерация, С1 С12N 5/071; С12N 5/02. Способ модификации пролиферативной активности клеточных культур млекопитающих № 2019102300 : заявл. 28.01.2019 : опубл. 10.01.2020 / Трофименко А.И., Гилевич И.В., Федоренко Т.В., Коломийцева Е.А., Порханов В.А., Поляков И.С., Богданов С.Б., Цуров А.Б., Сергеева Ю.А. ; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт Краевая клиническая больница N 1 имени профессора С.В. Очаповского" Министерства Здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ - Краевая клиническая больница N 1 имени профессора С.В. Очаповского" Министерства здравоохранения Краснодарского края). – Бюл. № 1. – 16 с.**

6. Sergeeva, Yu.A. D-Asparagine Improves of Lipofilling Efficacy In Treatment of Experimental Dermal Scars / Yu.A. Sergeeva, A.Kh. Kade, A.I. Trofimenko. – DOI: 10.36648/2576-3938-C1-003 // Journal of Emergency and Internal Medicine. – 2020. – Vol. 04. – P. 63.

****7. Влияние D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека / Ю.А. Сергеева, А.И. Трофименко, Т.В. Федоренко [и др.]. – DOI: 10.14300/mnnc.2020.15085 // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15, № 3. – С. 360-363.**

8. Сергеева, Ю.А. D-аспарагин повышает эффективность липофилинга при лечении экспериментальных дермальных рубцов / Ю.А. Сергеева // Сборник 88-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием, посвященной 100-летию НОМУС им. И.И. Мечникова. – Иркутск : 2021. – С. 299.

9. Сергеева, Ю.А. D-аспарагин как модулятор пролиферативной активности дермальных фибробластов человека / Ю.А. Сергеева // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. – Москва : МАКС Пресс, 2021. – ISBN 978-5-317-06593-5. – URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2021/data/info.htm (дата обращения: 21.06.2021).

*** – Работа опубликована в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основные научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.**

**** – Работа опубликована в издании, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованном ВАК при Минобрнауки России для опубликования основные научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.**

***** – Патенты.**