

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

СЕРГЕЕВА Юлия Анатольевна

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

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Каде Азамат Халидович
Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Гайворонская Татьяна Владимировна

Краснодар – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Характеристика липофилинга как метода лечения кожных рубцов.....	15
1.2. Биологическая роль и метаболизм D-аспартата и D-аспарагина.....	24
1.3. Возможные механизмы, опосредующие влияние D-аспартата и D-аспарагина на пролиферативную активность клеток.....	39
Глава 2. Материалы и методы исследования	46
2.1. Характеристика объектов исследования.....	46
2.2. Схема эксперимента.....	46
2.3. Модель дермального рубца.....	48
2.4. Методика забора липоаспирата и проведения липофилинга.....	49
2.5. Методика выполнения забора кожи у крыс.....	50
2.6. Методики гистологического и иммуногистохимического исследования кожи крыс.....	51
2.7. Протокол выделения дермальных фибробластов человека и ведения их первичной культуры.....	54
2.8. Методика анализа пролиферативной активности клеток.....	55
2.9. Методика анализа метаболической активности клеток.....	55
2.10. Методики цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека.....	55
2.11. Методы статистического анализа.....	57
Глава 3. Результаты собственных исследований	58
3.1. Влияние D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека	58
3.1.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека.....	58
3.1.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека.....	59

3.2. Влияние D-аспарагина на метаболическую активность дермальных фибробластов человека	61
3.2.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека.....	61
3.2.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека.....	62
3.3. Влияние D-аспарагина на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека	64
3.3.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека.....	64
3.3.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека.....	65
3.4. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на результаты морфометрии кожи в зоне дермального рубца	68
3.4.1. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на толщину эпидермиса в зоне дермального рубца.....	68
3.4.2. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на толщину дермы в зоне дермального рубца.....	70
3.5. Результаты гистологического исследования кожи и липографта в зоне дермального рубца	72
3.6. Результаты иммуногистохимического исследования кожи и липографта в зоне дермального рубца	79
Глава 4. Обсуждение полученных результатов	84
4.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 и 0,13 г/л на первичную культуру дермальных фибробластов человека.....	84
4.2. Влияние D-аспарагина на результаты липофилинга на модели дермального рубца крысы.....	92

Заключение	100
Выводы	101
Практические рекомендации	103
Список сокращений и условных обозначений	104
Список литературы	106
Приложения	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы 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. Borovikova 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

кровообращения, 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, B. Harrison, J.E. Janis, 2016; B. Berman, A. Maderal, B. 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-аспарагинила, 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.

Впервые 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.

Впервые 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.

Впервые 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 работы

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.

Методология и методы исследования

В работе использовали 60 самцов белых нелинейных крыс массой 272 ± 15 г., а также первичную культуру дермальных фибробластов человека.

Характеристика групп животных:

группа 1 (контроль, $n=20$) – липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей;

группа 2 (сравнения, $n=20$) – липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия на 5-е и 12-е сутки эксперимента;

группа 3 (опытная, $n=20$) – липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина на 5-е и 12-е сутки эксперимента.

На 42-е сутки эксперимента у всех животных из групп №1-3 проводили липофилинг, а на 105-е сутки (через 2 месяца) – забор кожи в зоне рубца для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования.

Характеристика групп при проведении культуральных исследований:

Группа 1 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,013 г/л в течение 2-х часов;

Группа 2 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,013 г/л в течение 6 часов;

Группа 3 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,013 г/л в течение 24-х часов;

Группа 4 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,013 г/л в течение 48 часов;

Группа 5 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,13 г/л в течении 2-х часов;

Группа 6 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,13 г/л в течение 6 часов;

Группа 7 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,13 г/л в течение 24-х часов;

Группа 8 – культивирование дермальных фибробластов человека с D-аспарагином в концентрации 0,13 г/л в течение 48 часов;

Контроль – культивирование дермальных фибробластов человека на питательной среде без D-аспарагина течение 72 часов.

Введение полной питательной среды с D-аспарагином в группах №1-8 осуществлялось после 24-х часов от момента посева культуры дермальных фибробластов человека (3 пассаж). По окончании заданного временного периода воздействия в группах №1-3 и №5-7 производили замену полной питательной среды (на среду того же состава, но без D-аспарагина), далее продолжали культивирование дермальных фибробластов человека до 72 часов. Таким образом, как в контроле, так и в группах №1-8 продолжительность культивирования составила 72 часа.

Методы исследования:

Протокол модели дермального рубца в эксперименте у крыс.

Протокол проведения липофилинга в эксперименте у крыс.

Протокол выделения дермальных фибробластов человека и ведения их первичной культуры.

Гистологическое и гистоморфометрическое исследование окрашенных гематоксилин-эозином и по Маллори-Слинченко микропрепаратов кожи и липографта в зоне дермального рубца.

Иммуногистохимический анализ микропрепаратов кожи с антителами на коллаген 1 типа, vWF, АРМАР, АIF-1, виментин.

Пролиферативную активность дермальных фибробластов человека рассчитывали по среднему времени удвоения клеточной популяции.

Метаболическую активность дермальных фибробластов человека определяли колориметрическим методом с использованием ХТТ соли тетразолия.

Для проведения кариотипирования и цитологического исследования дермальных фибробластов человека, их обрабатывали колхицином, а затем окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Иммуноцитохимические исследования дермальных фибробластов человека на виментин, р53 и Ki-67.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью one-way ANOVA и post-hoc тестов с использованием «MS Excel 2010» (Microsoft, США), «GraphPadPrism 7» (GraphPad Company, США) и «Statistica 13» (StatSoft Inc, США).

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 при изолированном применении липофилинга 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 в практику.

Основные результаты проведенного 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 результатов исследования

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.

По результатам проведенной исследовательской работы получено 2 патента РФ на изобретение:

Патент РФ №27107118 приоритет изобретения от 28.01.2019 г. «Способ модификации пролиферативной активности клеточных культур млекопитающих».

Патент РФ №2691647 приоритет изобретения от 29.11.2018 г. «Средство для профилактики образования патологических кожных рубцов».

Личный вклад автора в исследование

Диссертантом определены цели и задачи исследования (75%) и разработан его дизайн (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%), пробоподготовка и анализ биоматериала (93%), статистическая обработка результатов исследования (94%). Автор принимал участие в подготовке научных положений и выводов диссертации, предложений для внедрения и практических рекомендаций (92%).

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 148 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика липофилинга как метода лечения кожных рубцов

Липофилинг – это аутологичная трансплантация жировой ткани (Ауто ЖТ), преимущественно применяется для заместительной коррекции зон с дефицитом объема (F. Simonacci et al., 2017). Липофилинг считается ведущим способом эстетической коррекции дефицита мягких тканей лица и контуров тела (S.L. Spear et al., 2016).

Широкое распространение липофилинга обусловлено тем, что в отличие от большинства коммерческих филлеров Ауто ЖТ полностью биосовместима, естественно интегрируется в ткани собственного организма (S.R. Coleman, 2006).

Ауто ЖТ считается идеальным наполнителем дефектов тканей, ее введение безопасно и сопровождается минимальным количеством осложнений, при этом жировая ткань в достаточном количестве имеется у большинства пациентов (Г.М. Саруханов и др., 2013; E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio, 2017; F. Simonacci et al., 2017).

Бум использования липофилинга с одной стороны обусловлен повсеместной распространенностью и растущей популярностью липосакции (E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio, 2017), а с другой – такими его эффектами как стимуляция регенерации, омоложение и улучшение качества кожи (L. Charles-de-Sá et al., 2015; A. Mohan, S. Singh, 2017).

Липофилинг является одним из основных методов в восстановительной и эстетической хирургии, при этом его популярность продолжает расти. В частности, липофилинг применяется для омоложения и бьютификации лица, увеличения груди, реконструкции молочных желез после мастэктомии, увеличения ягодиц, коррекции контуров голени, контурной пластики передней брюшной стенки, лечения рубцов, ожогов, трофических язв, ВИЧ-

ассоциированной липодистрофии, устранения деформаций и коррекции дефектов мягких тканей, лечения осложнений эндопротезирования и радиационных поражений (R.K. Khoufi, 2017; F. Simonacci et al., 2017).

Открытие МСК ЖТ привело к пересмотру роли Ауто ЖТ от простого наполнителя до стимулятора регенерации, чем обусловлен лавинообразный рост сферы применения Ауто ЖТ, стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ ЖТ), а также их производных (R.J. Ross et al., 2014; E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio, 2017; F. Simonacci et al., 2017).

В связи с накоплением результатов клинических исследований в области липофилинга и разработкой оптимальных методик забора, обработки и применения Ауто ЖТ произошло смещение фокуса научных исследований в сторону поиска оптимальных способов повышения выживаемости липографта и уменьшения числа, необходимого для достижения эффекта, сеансов липофилинга (R.J. Ross et al., 2014; E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio, 2017).

На фоне интенсивного накопления клинического опыта активизировалось развитие теоретической базы липофилинга, произошел пересмотр и отказ от концепции оверграфтинга (R.J. Ross et al., 2014). Предложенная в начале 50-х годов прошлого века теория выживания жировой ткани, базирующаяся на восстановлении кровоснабжения липографта (L.A. Peer, 1955) была переработана на основе исследований группы доктора К. Yoshimura (H. Eto et al., 2012).

Для микроциркуляции из капилляров реципиентной зоны доступен лишь поверхностный слой липографта толщиной не более 300 мкм, дальнейшее восстановление кровотока происходит за счет неоангиогенеза. Значительная часть адипоцитов в трансплантате погибает от гипоксии в течение 24 часов после трансплантации (H. Eto et al., 2012).

На основе полученных данных выдвинута теория замещения клеток в липографте, так как до развития полноценной капиллярной сети в трансплантате за счет неоангиогенеза выживают МСК ЖТ из СВФ ЖТ, за их счет поддерживается численность адипоцитов в липографте (T. Mashiko, K. Yoshimura, 2015).

На основе приведенных выше исследований можно сформулировать ключевые условия выживания Ауто ЖТ после липофилинга:

1. Уменьшение выраженности повреждения клеток липоасpirата при его заборе, обработке и трансплантации;
2. Достаточный, для приживления липографта, уровень микроциркуляции реципиентной зоны;
3. Эффективный неоангиогенез;
4. Достаточное для процессов неоангиогенеза и адипогенеза количество МСК ЖТ.

Для выполнения первого условия первостепенную важность имеет применение щадящих методов липосакции и обработки жировой ткани, а также техника липофилинга (F. Simonacci et al., 2017).

В случае липофилинга на фиброзированных тканях, зачастую наблюдающийся в реципиентной зоне, недостаточный уровень кровообращения (K. Mineda et al., 2014), является причиной низкой приживляемости, ранней и отсроченной резорбции, некроза, хронического воспаления и кальцификации липографта (K. Mineda et al., 2014; S. Gal, J.I. Ramirez, P. Maguina, 2017).

Реализация третьего и четвертого условия является «слабым звеном», так как в ходе получения липоасpirата и его подготовки к трансплантации происходит значительное снижение содержания жизнеспособных МСК ЖТ (J. Laloze et al., 2018; J.D. Svalgaard et al., 2020). По мнению многих исследователей это является причиной отсроченной резорбции липографта в течение полугода после выполнения липофилинга (J. Laloze et al., 2018; J.D. Svalgaard et al., 2020).

Для решения проблемы резорбции и повышения выживаемости липографтов разработаны следующие подходы:

- 1) обогащение липоасpirата СВФ ЖТ и МСК ЖТ (N.F. Gontijo-de-Amorim, L. Charles-de-Sá, G. Rigotti, 2017; B.S. Rasmussen et al., 2019);
- 2) применение Ауто ЖТ совместно с плазмой обогащенной тромбоцитами (ПОТ) (J.M. Serra-Mestre et al., 2014; I.B. James, S.R. Coleman, J.P. Rubin, 2016; F. Virzi et al., 2017);

3) использование факторов роста для повышения выживаемости Ауто ЖТ (R.J. Ross et al., 2014; F. Yu et al., 2020).

4) использование вышеперечисленных подходов в комбинации (B. Bertrand et al., 2020; P. Gentile et al., 2021).

Рядом автором показано, обогащение липоасpirата СВФ ЖТ препятствует уменьшению объема и повышает выживаемость липографта (N.F. Gontijo-de-Amorim, L. Charles-de-Sá, G. Rigotti, 2017; B.S. Rasmussen et al., 2019).

МСК ЖТ содержащиеся СВФ ЖТ, в отличие от зрелых адипоцитов, обладают устойчивостью к дефициту кислорода, под воздействием гипоксии происходит стимуляция их дифференцировки в ангио- и адипогенном направлениях (P. Li, X. Guo, 2018).

Использование липоасpirата совместно с МСК ЖТ содержащимися в составе СВФ ЖТ, прошедшими под воздействием гипоксии дифференцировку в направлении эндотелиального фенотипа, стимулирует неоангиогенез и повышает выживаемость клеток липографта (W.M. Harris et al., 2018).

Однако по данным M. Li и C. Chen, липофилинг с использованием СВФ ЖТ в сравнении изолированным применением Ауто ЖТ в ходе морфологического исследования не показал различий в выживаемости трансплантированного жира при проведении маммопластики (M. Li, C. Chen, 2021).

На основе опыта применения ПОТ в качестве добавки к липоасpirату показано, что факторы роста присутствующие в тромбоцитах стимулируют пролиферацию и дифференцировку МСК ЖТ, пролиферацию эндотелиоцитов, что благоприятно сказывается на ангиогенезе и адипогенезе в липографте (H.T. Liao, K.G. Marra, J.P. Rubin, 2014).

Согласно данным S. Nakamura и соавт. использование ПОТ при липофилинге у крыс, в сравнении с изолированным применением липоасpirата, сопровождается лучшими показателями ангиогенеза и выживаемости адипоцитов в липографте, на протяжении 4-х месяцев от проведения операции (S. Nakamura, 2010).

Использование ПОТ совместно с Ауто ЖТ при липофилинге с целью реконструкции молочных желез сопровождается сохранением до 69% пересаженного жира, что практически в два раза превышает результаты изолированного применения липоаспирата. В образцах липографтов (ПОТ+Ауто ЖТ) отмечается большее количество адипоцитов и кровеносных сосудов, снижено содержание кист, вакуолей и фиброзированной ткани (P. Gentile, 2013).

Метаанализ 6 доклинических и 9 клинических исследований по применению ПОТ при липофилинге показал, что ПОТ в целом оказывает положительный дозозависимый эффект на выживаемость липографта (J.M. Serra-Mestre, 2014).

Более поздний метаанализ направленный на изучение влияния ПОТ на выживаемость Ауто ЖТ проведенный на основе одиннадцати исследований с участием 1125 пациентов также показал, что трансплантация Ауто ЖТ с усилением ПОТ более эффективна, в сравнении с традиционным липофилингом (M. Wu et al., 2021).

Использование факторов роста для повышения эффективности липофилинга, является во многом попыткой нивелировать недостатки использования ПОТ (Ю.А. Сергеева, А.Х. Каде, С.Б. Богданов, А.И. Трофименко, 2019).

В связи с отсутствием единой общепринятой технологии получения и стандартизации ПОТ для липофилинга и, как следствие, непостоянством содержания ростовых факторов в ее составе, представляется логичным изолированное использование факторов роста. Интересным способом реализации данного подхода, является использование биodeградируемых микросфер для контролируемой, долгосрочной локальной доставки адипогенных ростовых факторов. Использование биodeградируемых микросфер с инсулином и дексаметазоном (A. Kelmendi-Doko et al., 2014), а также микросфер с VEGF и ангиогенином-1 (Y. He, X. Yu, Z. Chen, L. Li, 2019) снижает выраженность фиброзирования, а также повышает васкуляризацию и выживаемость липографта.

Значительное число клинических исследований посвящено изучению липофилинга как метода лечения патологических кожных рубцов, в частности, ожогового генеза (А. Condé-Green, 2016; Т.К. Krastev et al., 2020; Р. Gentile et al., 2021). Схематическое изображение предлагаемого механизма Ауто ЖТ при лечении дермальных рубцов представлено на рисунке 1.1.1.

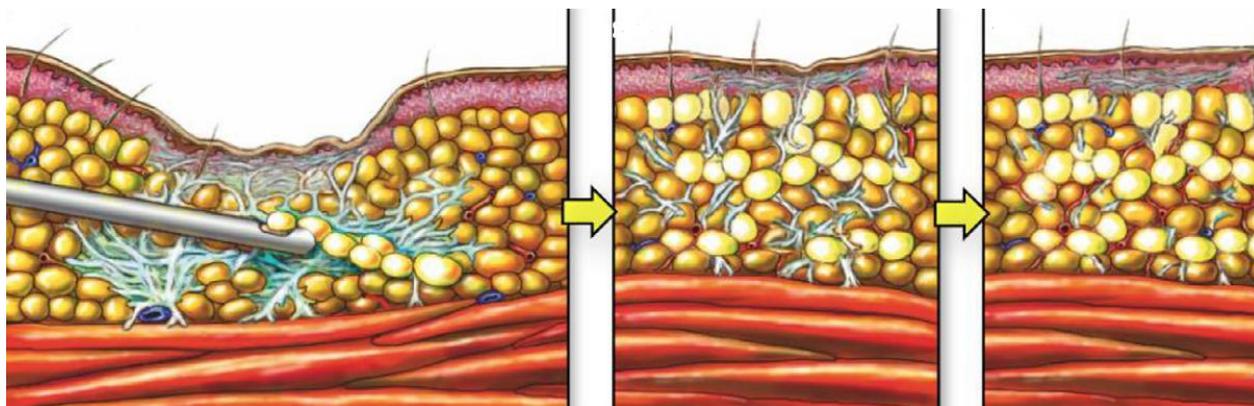


Рисунок 1.1.1 – Схематическое изображение предлагаемого механизма действия Ауто ЖТ при лечении дермальных рубцов (из Krastev Т.К., Schop S.J., Hommes J. et al., 2020 с изменениями)

Ведущую роль в противорубцовом эффекте липофилинга отводят присутствующим в составе липоаспирата МСК ЖТ (М. Spiekman et al., 2017; А.А. Borovikova et al., 2018; L. Vriend, J.A. van Dongen, B. van der Lei, H.P.J.D. Stevens, 2020).

Антифибротический эффект МСК ЖТ связан продукцией HGF (J. Ma et al., 2020), PGE₂, IL-10 и NO (B.F. Seo, S.N. Jung, 2016), а также подавлением Notch-1 и TGF-1 β сигналинга (B. Nan et al., 2019).

PGE₂ ингибирует функцию НК-клеток, дендритных клеток, индуцирует продукцию IL-10 Т-лимфоцитами и макрофагами (S.M. Melief et al., 2013).

IL-10, являющийся одним из основных противовоспалительных цитокинов, способствует уменьшению повреждения тканей в ходе воспаления, а также ингибирует гиперпродукцию TGF-1 β (J.H. Shi et al., 2013).

HGF является фактором роста, который модулирует активность фибробластов, в частности подавляет TGF-1 β и IL-13 опосредованную пролиферацию фибробластов, гиперпродукцию коллагенов I и III типов,

стимулирует экспрессию матриксных металлопротеиназ участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса (J. Ma et al., 2020).

Схематическое изображение предполагаемого механизма лечебного эффекта МСК ЖТ при лечении дермальных рубцов представлено на рисунке 1.1.2.

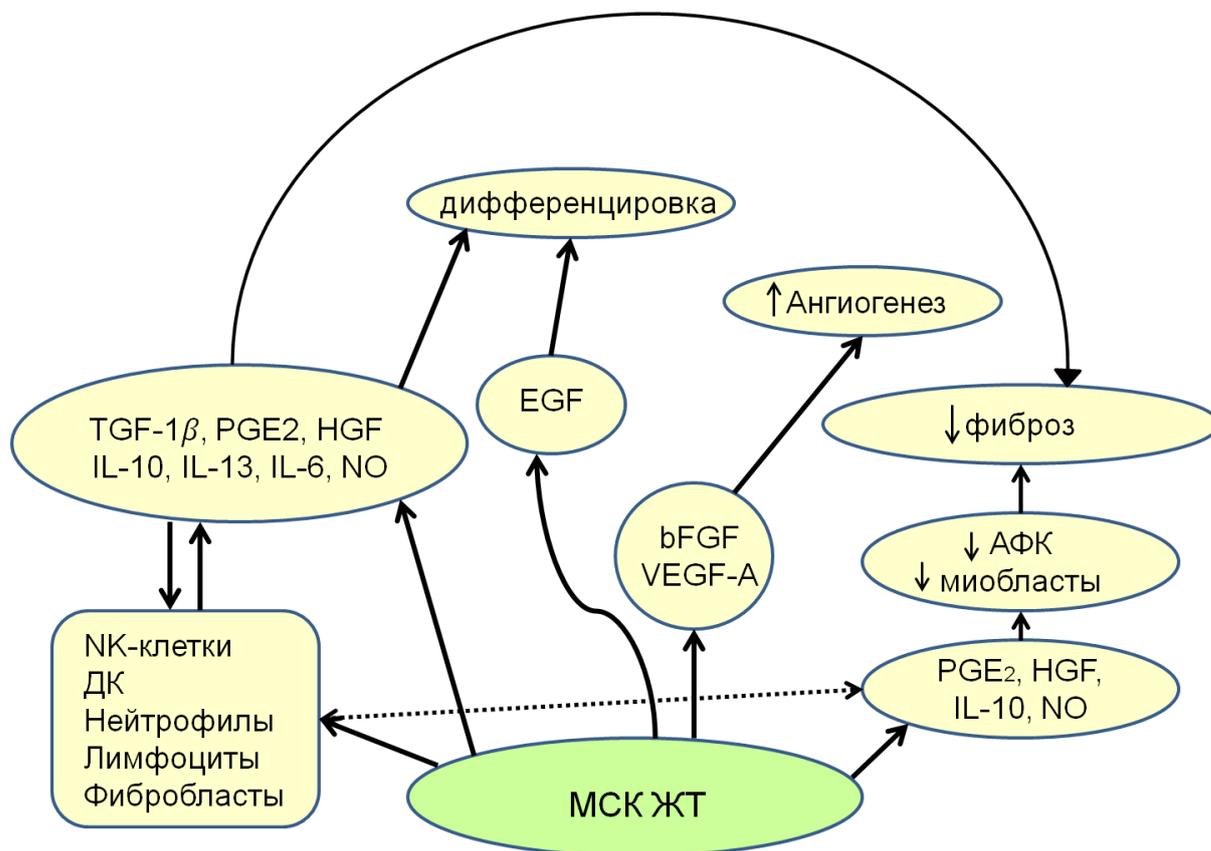


Рисунок 1.1.2 – Механизм антирубцового эффекта МСК ЖТ (расшифровка сокращений приведена в тексте)

МСК ЖТ являются активными продуцентами bFGF и VEGF-A, данные факторы роста стимулируют ангиогенез (F. Yu et al., 2020).

По предложению R.K. Khouri и соавт., использование липофилинга для лечения рубцовых контрактур является эффективной альтернативой другим хирургическим методам (R.K. Khouri et al., 2013).

Липофилинг вошел в клиническую практику как перспективный метод лечения пациентов со стягивающими и болезненными рубцами, ограничивающими подвижность задействованного сустава (H. Riyat, L.L. Touil, M. Briggs, K. Shokrollahi, 2017).

Применение липофилинга для лечения кожных рубцов сопровождается регенерацией дермы и подкожной жировой клетчатки (Т.К. Krastev et al., 2020). Считается, что регресс невропатической боли после проведения липофилинга обусловлен высвобождением нервных волокон в области рубца (R. Fredman, R.E. Edkins, C.S. Hultman, 2016).

По данным М. Klinger и соавт., применение липофилинга для лечения рубцов нормализует эластичность, растяжимость и цвет кожных покровов, способствует регрессу болевого синдрома, а также сопровождается улучшением подвижности пораженной рубцами части тела (М. Klinger et al., 2013).

Известны исследования показавшие отсутствие значимого клинического эффекта после применения липофилинга для лечения рубцов, в частности, ожогового происхождения. Относительно низкая эффективность традиционного липофилинга в области обширных, зрелых рубцов обусловлена недостаточным уровнем микроциркуляции в реципиентной зоне. Недостаточный уровень микроциркуляции является фактором ограничивающим приживление трансплантированной Ауто ЖТ, что требует поиска новых подходов для решения данной проблемы (S. Gal et al., 2017; С.М. Oranges et al., 2018; С.М. Oranges et al., 2019).

Способности реципиентной зоны поддерживать приживление липографта в настоящее время уделяется немало внимания. Одним из перспективных хирургических способов решения данной проблемы является чрескожная апоневротомия в сочетании с липофилингом (риготомия). Ключевым компонентом успеха риготомии является преобразование стягивающего рубца в свободную трехмерную регенеративную матрицу поддерживающую приживление Ауто ЖТ (М.Т.С. Sambuy et al., 2020).

При чрескожной апоневротомии в нескольких плоскостях, формируется сеть небольших карманов заполняемых Ауто ЖТ, что приводит к увеличению площади поверхности и подвижности апоневроза (R.K. Khouri et al., 2013).

Несмотря на позитивный клинический опыт применения риготомии для лечения контрактуры Дюпюитрена, рубцов после лучевой терапии,

маммопластики после мастэктомии, лечения рубцов ограничивающих подвижность конечностей назрела необходимость в разработке клинических рекомендаций по использованию данного метода (J.P. Rubin, D. Smith, 2013).

Нанолипофилинг является модификацией липофилинга, направленной преимущественно на стимуляцию регенерации и ремоделирование тканей. Ввиду особенностей процессинга Ауто ЖТ данный метод практически непригоден для заполнения дефектов контуров тела и коррекции атрофических рубцов. Основной особенностью нанолипофилинга является применение эмульсифицированной, разведенной и профильтрованной через сетку с диаметром пор 0,4-0,6 мм Ауто ЖТ (нанофат). После эмульгирования Ауто ЖТ происходит практически полная элиминация зрелых адипоцитов, при этом в ней сохраняются МСК ЖТ из присутствующей изначально в ткани СВФ ЖТ (P. Tonnard et al., 2013; A. Verpaele, P. Tonnard, M. Ghiasloo, 2020).

Несмотря на то, что эмульсификация является травмирующим методом процессинга липоаспирата, существуют исследования показавшие, что в ходе данной процедуры не происходит снижения жизнеспособности клеток СВФ ЖТ содержащихся в его составе (R. Osinga et al., 2015).

Интересным фактом представляется сдвиг фенотипа МСК ЖТ в сторону эндотелиальной и адипогенной дифференцировки как результат механической обработки Ауто ЖТ (D.A. Banyard et al., 2016).

Особенностью применения нанолипофилинга является то, что нанофат с помощью микроинъекций вводится в верхние слои дермы реципиентной зоны. В основе лечебного действия нанолипофилинга лежит не только влияние нанофата, но и вероятно эффект «иглы» (A. Hou et al., 2017).

Использование нанолипофилинга для лечения рубцов позволяет достигнуть улучшения качества кожных покровов, в частности, кожа становится более эластичной, ее цвет приближается к естественному (P. Tonnard, A. Verpaele, M. Carvas, 2019).

1.2. Биологическая роль и метаболизм D-аспартата и D-аспарагина

Первые D-аминокислоты в живых организмах обнаружены в свободном состоянии, а также в составе некоторых белков около 50 лет назад (А.В. Червяков, Н.В. Гуляева, М.Н. Захарова, 2011; А.В. Червяков, М.Н. Захарова, Н.Б. Пестов, 2014; G. Genchi, 2017). D-аспартат в свободном виде, у млекопитающих (в организме крысы и человека), впервые обнаружен в конце 1980-х годов (D.M. Dunlop et al., 1986). В дальнейшем свободный D-аспартат выявлен в ЦНС крыс (A. Hashimoto, T. Oka, T. Nishikawa, 1995), мышей (D. Punzo et al., 2016; F. Errico et al., 2018; A. De Rosa et al., 2020) и человека (T. Nuzzo et al., 2017; F. Errico et al., 2020).

Структурные формулы D- и L-стереоизомеров аспартата, L- и D-стереоизомеров аспарагина представлены на рисунке 1.2.1.

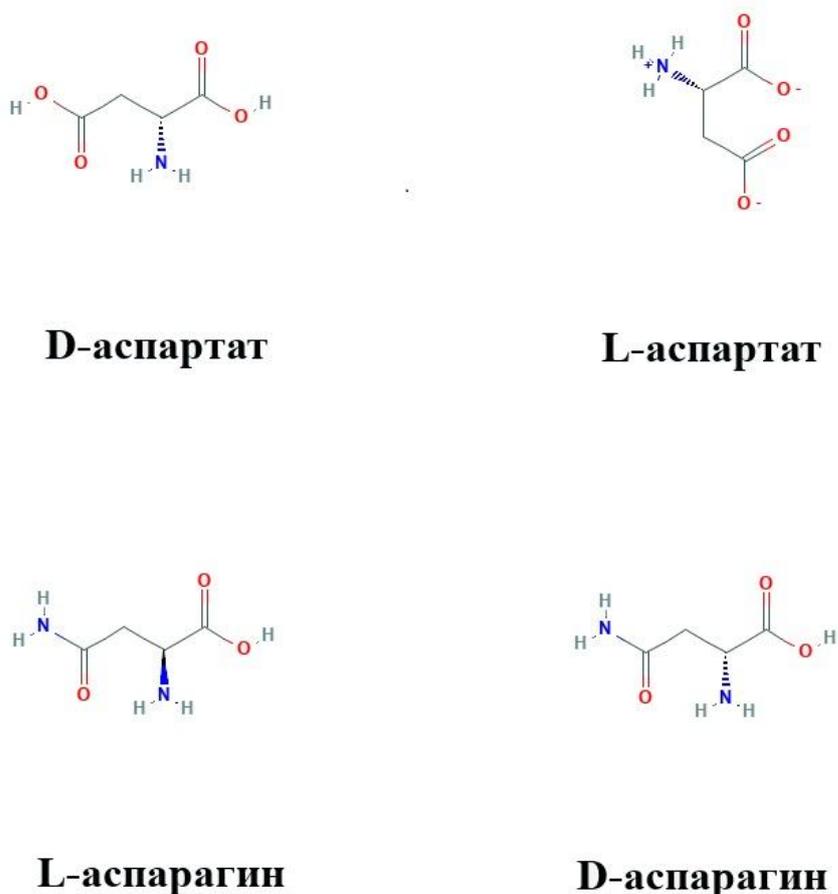


Рисунок 1.2.1 – Структурные формулы D- и L-стереоизомеров аспартата, L- и D-стереоизомеров аспарагина (слева-направо)

D-аспарагин в свободном виде выявлен в гомогенатах головного мозга и в сыворотке крови крысы (A. Hashimoto et al., 1992), а также в сыворотке крови человека (T. Kimura et al., 2016; M. Han et al., 2018).

Несомненный интерес представляют данные о том, что содержание D-аспарагина в ликворе человека на порядок выше, чем уровень D-аспартата (W.F. Visser et al., 2011). При этом в ликворе концентрация D-аспарагина значительно выше, чем в плазме крови человека (W.F. Visser et al., 2011).

В моче человека доля D-аспарагина составляет 17% по отношению к концентрации D,L-аспарагина, в тех же условиях концентрация D-аспартата находится ниже порога чувствительности метода (M. Harada et al., 2020).

Однако некоторые расхождения в содержании D-аспарагина могут быть обусловлены конверсией D-аспарагина в D-аспартат происходящей во время хранения образцов биоматериала (S.A. Fuchs et al., 2005).

D-аспарагин имеет тенденцию к накоплению в плазме крови пациентов с хронической болезнью почек, в связи с чем, может рассматриваться как биомаркер данного заболевания (T. Kimura et al., 2016; A. Furusho et al., 2019; T. Kimura, A. Hesaka, Y. Isaka, 2020).

Хотя аминокислоты преимущественно присутствуют в тканях млекопитающих в L-форме выявлено, что содержание D-аспартата в префронтальной коре (ПФК) человеческого эмбриона превышает количество его L-энантиомера, при этом уровень D-аспартата резко снижается во взрослом возрасте (F. Errico et al., 2012; F. Errico et al., 2020; S. Takahashi, 2020).

Согласно результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) соотношение D-аспартат / общий аспартат (DL-аспартат) в головном мозге (человек, крыса и мышь) резко снижается после рождения и сохраняется на очень низком уровне в зрелом возрасте (D. Punzo et al., 2016; M. Cuomo et al., 2019).

Представляет интерес, что в целом необычайно высокое соотношение D-аспартат / общий аспартат (DL-аспартат) в нервной системе эмбриона, тем не менее, имеет различную величину у человека и грызунов. В ЦНС мышей уровень

D-аспартата никогда не превышает 12% от общего аспартата (A. De Rosa et al., 2020), при этом в гомогенате ПФК человека на 14 неделе внутриутробного развития его содержание достигает 65% (A. Hashimoto, 1993).

При анализе доли D-аспартата и D-аспарагина по отношению к D-,L-аспартату и D-,L-аспарагину в головном мозге и крови мышей выявлено, что доля D-аспартата в крови, гиппокампе и коре мозга (неперфузируемые препараты) составляет соответственно 18,9%, 4,6%, 12,2% и D-аспарагина составляет в крови, гиппокампе и коре мозга (неперфузируемые препараты) составляет соответственно 3,6%, 12,2%, 10,5% (C.A. Weatherly et al., 2017).

В случае определения содержания D-аспартата и D-аспарагина на перфузируемом головном мозге их доля соответственно составляет: в гиппокампе – 9,8% и 25,6%, а в коре мозга – 13,5% и 23,3% (C.A. Weatherly et al., 2017).

Предположительно, что D-аспарагин образуется путем спонтанной рацемизации из L-аспарагина (о чем косвенно свидетельствует крайне малая концентрация данной D-аминокислоты) и в дальнейшем подвергается неферментативному гидролизу до D-аспартата (S.A. Fuchs et al., 2005; C.A. Weatherly et al., 2017).

Биосинтез D-аспартата у млекопитающих впервые был идентифицирован в клетках феохромоцитомы (линия *PC12*) (Z. Long et al., 1998).

Впоследствии синтез D-аспартата также выявлен в клетках опухоли гипофиза крыс (линия *GH3*) (Z. Long et al., 2000) и в клетках аденокарциномы шейки матки человека (линия *HeLa*) (S. Matsuda et al., 2015).

В настоящее время образование D-аспартата и его биологическая роль во многих соматических тканях млекопитающих, несмотря на практически повсеместное расположение глутаматных рецепторов, является предметом дискуссий (M. Bozic, J.M. Valdivielso, 2015).

В качестве фермента конвертирующего L-аспартат в D-аспартат в головном мозге, ранее предложена пиридоксаль-5-фосфат-зависимая глутамат-оксалоацетат 1-подобная трансминаза 1 (*Got1L1*) (P.M. Kim et al., 2010).

Однако обнаружение сопоставимых уровней D-аспартата в гиппокампе мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Got1L1* позволило предположить наличие других путей синтеза D-аспартата в головном мозге млекопитающих (А. Tanaka-Nayashi et al., 2015). Полученные данные подтверждены S. Matsuda и соавт., показавшими, что гомологи *Got1L1* человека и крысы не осуществляют биосинтез D-аспартата (S. Matsuda et al., 2015).

В качестве альтернативного пути синтеза D-аспартата у млекопитающих рассматривается серинрацемаза (SRR) (M. Horio et al., 2013; T. Ito et al., 2016; M.D. Lloyd et al., 2021). Содержание D-аспартата снижено в переднем мозге (но не в мозжечке) мышей с нокаутом *d-srr*, что свидетельствует об участии данного фермента в синтезе D-аспартата в определенных отделах головного мозга (M. Horio et al., 2013; T. Ito et al., 2016).

Значимым путем образования D-аспартата (помимо поступления с пищей) является спонтанная неферментативная рацемизация из L-аспартата (J. Sasabe, M. Suzuki, 2018).

Высказано предположение, что образование D-аспартата за счет спонтанной рацемизации в кожных покровах происходит под влиянием УФ-излучения и окислительного стресса, а также ассоциировано со старением (S. Ritz-Timme et al., 2003; Y. Mori et al., 2011; N. Fujii et al., 2018).

При этом вопрос, как осуществляется биосинтез D-аспартата и D-аспарагина в соматических тканях (в том числе коже и жировой ткани), а также механизмы и биологическая значимость конверсии D-аспарагина в D-аспартат (по аналогии с превращением глутамина в глутамат) и особенности их влияния на регенерацию кожных покровов остаются практически неизученными (S.A. Fuchs et al., 2005; J.J. Bastings et al., 2019).

D-аспартат оксидаза (DDO) – является ферментом осуществляющим расщепление D-аспартата (F. Errico et al., 2018; F. Errico et al., 2020). DDO представляет собой пероксисомальный флавопротеин, который осуществляет окислительное дезаминирование D-аспартата с образованием α -оксалоацетата,

перекиси водорода и аммиака (G. Molla et al., 2019; S. Takahashi, 2020; M. Katane et al., 2020; V. Puggioni et al., 2020).

Локализация DDO в пероксисомах позволяет клетке безопасно утилизировать образующуюся при расщеплении D-аспартата перекись водорода (M. Katane et al., 2010). Проведена подробная характеристика DDO, которая дает полезные сведения об характерных особенностях фермента у крыс, мышей и человека (M. Katane et al., 2015). Ген *ddo* человека продуцирует альтернативные транскрипты кодирующие три предполагаемых изоформы DDO, которые состоят: из 341 («каноническая» форма), 369 и 282 аминокислотных остатков (S. Sacchi, P. Cappelletti, G. Murtas, 2018; V. Rabattoni et al., 2021).

Примечательно, что DDO экспрессируется в ЦНС во время постнатальной жизни преимущественно в популяции нейронов (P.P. Van Veldhoven, C. Brees, G.P. Mannaerts, 1991; K. Zaar et al., 2002; M. Katane et al., 2010).

Экспрессия мРНК *ddo* значительно увеличивается в головном мозге мыши при переходе от эмбрионального к постнатальному периоду развития (D. Punzo et al., 2016). Изменения транскрипции *ddo* в головном мозге обусловлены активным деметилированием его промоторной области (D. Punzo et al., 2016; F. Errico et al., 2020).

Данное открытие демонстрирует влияние метилирования ДНК на транскрипцию *ddo* и таких генов участвующих в метаболизме D-серина и D-аспартата, как *daao* (ген оксидазы D-аминокислот), *d-srr* и *g72* (S. Sacchi et al., 2008), мыши и человека (E. Florio et al., 2017; V. Jagannath et al., 2017; S. Keller et al., 2018; M. Cuomo et al., 2019). Анализ комбинаций метилированных эпиааллелей показывает наличие характерного для клеток ЦНС паттерна метилирования на промоторе *ddo* (M. Cuomo et al., 2019).

Нейрофармакологические исследования конца 80-х годов XX века показали, что D-аспартат является одним из физиологических лигандов NMDA-типа глутаматных рецепторов (R.W. Ransom, N.L. Stec, 1988). Электрофизиологические эксперименты продемонстрировали, что локальные аппликации D-аспартата на переживающих срезах мозга мышей запускают внутренние токи, которые

блокируются конкурентными и неконкурентными антагонистами NMDA-типа глутаматных рецепторов (F. Errico et al., 2008; P. Krashia et al., 2016).

Однако остаточные D-аспартат-зависимые входящие токи сохраняются даже после применения высоких доз антагонистов NMDA-рецепторов (F. Errico et al., 2008; F. Errico et al., 2011), что косвенно свидетельствует о том, что D-аспартат является лигандом и других типов глутаматных рецепторов (F. Errico et al., 2011).

Последующие исследования показали, что D-аспартат также ингибирует индуцированные каиновой кислотой токи глутаманого рецептора AMPA-типа в нейронах гиппокампа крысы и стимулирует метаботропный рецептор глутамата 5 типа (mGluR5) на переживающих срезах головного мозга грызунов (X.Q. Gong et al., 2005; G. Molinaro et al., 2010; S. Sacchi et al., 2017).

Как и в гиппокампе, полосатом теле и спинном мозге (S. Voccella et al., 2015), так и в дофаминергических нейронах компактной части черной субстанции D-аспартат запускает внутренние токи за счет активации NMDA-, AMPA- и mGluR5-типов глутаматных рецепторов (P. Krashia et al., 2016).

По результатам исследования первичных нейрональных культур и синаптосомных препаратов показано, что D-аспартат высвобождается из окончаний аксонов посредством Ca^{2+} -опосредованных процессов (H. Wolosker, A. D'Aniello, S.H. Snyder, 2000), также возможно его спонтанное высвобождение или обмен с участием белка-транспортера L-глутамата (C.M. Anderson et al., 2001; L.K. Bak, A. Schousboe, H.S. Waagepetersen, 2003).

Микродиализные исследования показали, что D-аспартат способен эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и при этом обнаруживается в наномолярных концентрациях во внеклеточном пространстве ПФК мыши (F. Guida et al., 2015; S. Sacchi et al., 2017).

Также подтверждены ранние результаты (H. Wolosker, A. D'Aniello, S.H. Snyder, 2000), что свободный D-аспартат высвобождается нейронами посредством Ca^{2+} -зависимого механизма (S. Sacchi et al., 2017).

Внутриклеточное поглощение D-аспартата может быть опосредовано системами транспортеров L-глутамат / L-аспартат, которые распознают L-

глутамат, D- и L-энантиомеры аспартата (M. Palacín et al., 1998). Исследования *in vitro* показали, что D- и L-формы аспартата распознаются и со сравнимой аффинностью транспортируются гомологом переносчика глутамата Glut_{TK} (V. Arkhipova et al., 2019).

С целью изучения биологической роли DDO и D-аспартата в эндокринной и нервной системе млекопитающих выведены линии *ddo*-нокаутных мышей (A.S. Huang et al., 2006; Z.M. Weil et al., 2006; F. Errico et al., 2008). ВЭЖХ гомогенатов гиппокампа, полосатого тела, коры головного мозга, мозжечка, обонятельных луковиц и периферических органов *ddo*-нокаутных мышей выявила избирательное увеличение содержания D-аспартата в сравнении с особями дикого типа, в то время как различий в концентрации L-аспартата и L-глутамата не отмечено (F. Errico et al., 2006; A.S. Huang et al., 2006; F. Errico et al., 2011; D. Punzo et al., 2016).

Также выявлено значительное накопление эндогенного NMDA в гомогенатах головного мозга *ddo*-нокаутных мышей, предположительно обусловленное тем, что D-аспартат превращается в NMDA с помощью D-аспартатметилтрансферазы с участием S-аденозилметионина в качестве донора метильного радикала (F. Errico et al., 2006; F. Errico et al., 2011; S.A. Jami et al., 2020).

Содержание внеклеточного D-аспартата выше в ПФК у *ddo*-нокаутных мышей, чем у особей дикого типа (F. Errico et al., 2006; F. Errico et al., 2008; F. Errico et al., 2011; F. Errico et al., 2011; D. Punzo et al., 2016; F. Errico et al., 2020).

Полученные данные показывают, что нарушение катаболизма D-аспартата сопровождается ростом его внеклеточной концентрации (D. Punzo et al., 2016).

Однократное интраперитонеальное введение D-аспартата в разовой дозировке 500 мг/кг вызывало увеличение его содержания в головном мозге уже через 20 минут после инъекции (S. Sacchi et al., 2017).

Пероральное применение D-аспартата в течение одного месяца также вызывало внеклеточное увеличение D-аспартата в головном мозге мышей (F. Errico et al., 2008; F. Errico et al., 2011; S. Sacchi et al., 2017).

По данным А. Kitamura и соавт., через 15 минут после интрагастрального введения D-аспартата наблюдается выраженный рост его концентрации в гиппокампе крыс (А. Kitamura et al., 2018).

Таким образом, экзогенный D-аспартат способен проникать через ГЭБ в ткань головного мозга. До этих открытий считалось, что из D-аминокислот ГЭБ проницаем только для D-серина и D-пролина (D. Bauer et al., 2005; K.J. Langen et al., 2005).

Обращает внимание, что при введении экзогенного D-аспартата отмечается снижение содержания свободного L-глутамата в коре головного мозга, предположительно, за счет стимуляции пресинаптических глутаматных рецепторов (S. Sacchi et al., 2017).

В попытке понять биологическое значение повышенного уровня D-аспартата в период развития головного мозга создана модель *ddo*-нокаутных мышей с полным истощением пула свободного D-аспартата (А. De Rosa et al., 2020).

Полученные мыши жизнеспособны, плодовиты, взрослые животные имеют нормальную морфологию мозга и при этом, согласно результатам тестов на распознавание объектов и водного лабиринта Морриса обладают парадоксально улучшенными способностями к запоминанию. Выявленные особенности предположительно обусловлены изменением количества парвальбумин-положительных кортикальных интернейронов (А. De Rosa et al., 2020).

По данным функциональной магнитно-резонансной томографии применение экзогенного D-аспартата сопровождается повышением метаболической активности в гиппокампе и коре головного мозга (F. Errico et al., 2014).

Аномальные уровни D-аспартата влияют также на морфологию синапсов в головном мозге мышей (F. Errico et al., 2014). Фактически, повышенное содержание D-аспартата сопровождается ростом длины дендритов и плотности шипиков в ПФК и гиппокампе *ddo*-нокаутных и мышей получающих экзогенный D-аспартат (F. Errico et al., 2014).

В соответствии с полученными данными, *in vitro* показано, что воздействие D-аспартата на переживающие срезы гиппокампа крыс значительно увеличивает плотность шипиков нейронов гиппокампа посредством перестройки актиновых микрофиламентов (A. Kitamura et al., 2018).

С другой стороны гиперактивация NMDA-рецепторов является причиной глутаматной эксайтотоксичности и гибели клеток (G.E. Hardingham et al., 2003; T. Luo et al., 2011). Следовательно, аномально высокое содержание D-аспартата может также пагубно воздействовать на ткань головного мозга. Действительно, *ddo*-нокаутные мыши в возрасте 13-14 месяцев имели серьезный дефицит синаптической пластичности, пространственного обучения и памяти (F. Errico et al., 2011).

Высокое содержание D-аспартата в первичных кортикальных нейронах взрослых *ddo*-нокаутных мышей сопровождается выраженным нейровоспалением (D. Punzo et al., 2016; T. Nuzzo et al., 2019), что косвенно свидетельствует о защитной роли DDO.

Учитывая вышеприведенные данные, а также тот факт, что глутаматные рецепторы регулируют развитие, созревание и миграцию нейронов (H. Komuro, P. Rakic, 1993; V. Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; C. Ikonomidou, 2009; L.C. Jansson, K.E. Akerman, 2014), D-аспартат и D-аспарагин можно обоснованно считать сигнальными молекулами участвующими в развитии и функционировании ЦНС.

Железы внутренней секреции млекопитающих содержат значительное количество свободного D-аспартата и ферментов регулирующих его метаболизм (G. D'Aniello et al., 2007; M.M. Di Fiore et al., 2014; Y. Li et al., 2018; G.C. Vaccari et al., 2020).

DDO выявлена в проопиомеланокортин-позитивных (ПОМК) нейронах эпифиза и гипофиза (M.J. Schell, O. Cooper, S.H. Snyder, 1997; A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike, 2010), надпочечниках (M.J. Schell, O. Cooper, S.H. Snyder, 1997), щитовидной железе (E. Toro et al., 2009) и семенниках (L. Burrone et al., 2010; M. Di Giovanni et al., 2010).

У *ddo*-нокаутных мышей отмечается повышение содержания D-аспартата в тканях гипоталамуса, гипофиза, эпифиза, поджелудочной железы, надпочечников и яичников, что подчеркивает роль DDO в катаболизме D-аспартата в данных органах (A.S. Huang et al., 2006; H. Han et al., 2015).

При этом содержание D-аспартата у *daao*-нокаутных мышей выросло в эпифизе и практически не изменилось в гипоталамусе и гипофизе (A. Morikawa et al., 2001; K. Hamase et al., 2005; H. Han et al., 2011).

В отличие от динамики эндогенного D-аспартата в ходе развития головного мозга млекопитающих, его концентрация в гипофизе (A. Hashimoto, T. Oka, 1997; Y. Miyoshi et al., 2012), эпифизе (K. Imai, T. Fukushima, K. Hagiwara, T. Santa, 1995), надпочечниках (K. Sakai et al., 1997) и семенниках (G. D'Aniello et al., 2007), значительно повышается именно в период постнатального онтогенеза, с последующей стабилизацией у взрослых особей.

Полученные данные позволяют выдвинуть предположение о том, что D-аспартат играет определенную роль в созревании и функционировании органов эндокринной системы (A. Hashimoto, T. Oka, 1997).

При введении экзогенного D-аспартата взрослым млекопитающим, он накапливается в железах внутренней секреции и действует как индуктор синтеза и секреции гормонов (A. Hashimoto, T. Oka, 1997; M.M. Di Fiore et al., 2019).

В гипоталамусе крысы D-аспартат в основном содержится в магноцеллюлярных нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер (M.J. Schell et al., 1997; A. D'Aniello et al., 2000).

При этом повышение уровня D-аспартата стимулирует синтез окситоцина (H. Wang et al., 2000; N. Ota, T. Shi, J.V. Sweedler, 2012) и подавляет выделение дофамина в данной области головного мозга (M. Pampillo et al., 2002).

Экзогенный D-аспартат также стимулирует выделение гонадотропин-рилизинг гормона (GnRH), α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ), гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и повышает экспрессию NO-синтазы (A. D'Aniello, 2007).

Влияние экзогенного D-аспартата на гипоталамус похоже на действие D-серина на ГАМК-нейротрансмиссию (S.A. Jami et al., 2020).

Эпифиз является одним из рекорсменов по содержанию D-аспартата среди органов эндокринной системы (K. Hamase et al., 1997; S. Ishio et al., 1998; M. Tsunoda et al., 1999; H. Han et al., 2011; S. Karakawa et al., 2015; H. Han et al., 2020). Концентрация D-аспартата в эпифизе крыс подвержена колебаниям в зависимости от циркадного ритма (ночью выше, чем днем) (K. Imai et al., 1995).

Показано высокое содержание D-аспартата в пинеалоцитах секретирующих мелатонин (M.J. Schell, O. Cooper, S.H. Snyder, 1997; S. Yatsushiro et al., 1997). В ответ на стимуляцию норадреналином пинеалоциты крысы выделяли D-аспартат, при этом за счет ингибирования цАМФ секреция мелатонина снижалась (S. Ishio et al., 1998; Y. Takigawa et al., 1998).

В противовес полученным данным, H. Han с соавт. сообщают о положительной корреляции между концентрацией D-аспартата и количеством мелатонина в эпифизе грызунов (H. Han et al., 2020).

В надпочечниках крыс отмечено, что D-аспартат содержится преимущественно в хромоаффинных клетках продуцирующих катехоламины (M.J. Schell et al., 1997; J.A. Lee et al., 2001; H. Han et al., 2011).

Также в надпочечниках наблюдалось выделение D-аспартата в ответ на действие холинергической стимуляции (H. Wolosker, A. D'Aniello, S.H. Snyder, 2000).

Клетки феохромоцитомы крысы (линии *PC12* и *MPT1*) содержат D-аспартат в дофаминсодержащих секреторных гранулах, которые секретируются посредством Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза (S. Nakatsuka et al., 2001; Z. Long et al., 2002).

Представляет интерес, что у *ddo*-нокаутных мышей клетки надпочечников показывают иммунореактивность к D-аспартату (Z.M. Weil et al., 2006). Предполагается, что эффекты D-аспартата в эндокринных железах обусловлены стимуляцией глутаматных рецепторов (H. Yamada et al., 1997; A. Santillo et al., 2014).

Показано, что D-аспаратат действует на всех уровнях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГО), что позволяет предположить о важности его роли в репродуктивных процессах позвоночных (М.М. Di Fiore et al., 2016; Y. Li et al., 2018; M. Raspa et al., 2018; М.М. Di Fiore et al., 2019; M. Raspa et al., 2020).

D-аспаратат в значительном количестве содержится в гипофизе млекопитающих (К. Hamase, A. Morikawa, K. Zaitzu, 2002; E. Topo et al., 2010; A. Yamamoto, 2010; Y. Miyoshi et al., 2012; S. Karakawa et al., 2015). В гипофизе крысы наибольшее количество D-аспаратата обнаруживается в секретирующих пролактин клетках аденогипофиза (J.A. Lee et al., 2001).

Примечательно, что содержание D-аспаратата в гипофизе растет в ответ на эстроген, что приводит к росту количества клеток синтезирующих пролактин (J.A. Lee et al., 1999). Однако введение экзогенного D-аспаратата приводит к значительному увеличению выработки ЛГ, пролактина и СТГ (A. D'Aniello et al., 2000; M. Rampillo et al., 2002; E. Topo et al., 2009).

Высокое содержание D-аспаратата в промежуточной доле гипофиза у *ddo*-нокаутных мышей коррелирует со снижением выработки α -МСГ, что приводит к изменениям соотношения ПОМК / α -МСГ, что находит отражение в изменении меланокортин-опосредованного пищевого и сексуального поведения (A.S. Huang et al., 2006). Гипоталамус различных видов млекопитающих содержит значительное количество D-аспаратата, а также обладает способностью накапливать экзогенный D-аспаратат (A. D'Aniello, 2007).

В семенниках грызунов в момент рождения содержание D-аспаратата низкое, затем начиная с 7-недельного возраста постепенно повышается и остается на относительно стабильном уровне у взрослых животных (A. Hashimoto, T. Oka, 1997; G. D'Aniello et al., 2007; H. Han et al., 2011; H. Han et al., 2011).

D-аспаратат локализуется в половых клетках, а также в клетках Лейдига (K. Sakai et al., 1997; A. D'Aniello, 2007). Как пероральное, так и внутрибрюшинное введение D-аспаратата самцам крыс вызывает повышение уровня ЛГ в сыворотке крови (A. D'Aniello et al., 2000).

Накопленные данные позволяют сформулировать гипотезу о том, что D-аспартат стимулирует высвобождение GnRH и за счет активации ГГГО приводит к увеличению продукции половых стероидных гормонов (A. D'Aniello et al., 2000; G. D'Aniello et al., 2000; E. Topo et al., 2009; A. Santillo et al., 2014; F. Raucci, A. D'Aniello, M.M. Di Fiore, 2014).

В пользу данной гипотезы говорит тот факт, что введение экзогенного D-аспартата индуцирует значительное повышение уровня ЛГ в сыворотке крови, а также продукцию тестостерона и эпитестостерона в семенниках мышей (M. Raspa et al., 2018; M. Raspa, R. Paoletti, E. Mahabir, F. Scavizzi, 2020).

Повышение уровня половых гормонов является результатом действия D-аспартата на транскрипцию стероидогенного острого регуляторного белка (StAR), который является основным регулятором биосинтеза тестостерона в семенниках и индуктором экспрессии стероидогенных ферментов (A. Santillo et al., 2014; F. Raucci et al., 2014).

В соответствии полученными результатами показано, что D-аспартат, за счет регуляции активности стероидогенных ферментов, регулирует содержание биологически активных половых гормонов в головном мозге (L. Burrone et al., 2012; A. Santillo et al., 2013; M.M. Di Fiore et al., 2018).

В придатке яичка D-аспартат также регулирует продукцию андрогенов и эстрогенов, воздействуя на экспрессию генов 5α -редуктазы и *Cyp19a1* (семейство P450-ароматазы), соответственно (S. Falvo et al., 2016). Повышенная экспрессия рецепторов андрогенов и эстрогенов, наблюдаемая в придатках и семенниках крыс, получавших D-аспартат, указывает на его регуляторную роль в сперматогенезе и фертильности.

Эффекты D-аспартата на ГГГО, обнаруженные в исследованиях на животных, подтверждаются результатами экспериментов *in vitro*. D-аспартат индуцирует выделение ЛГ изолированным препаратом аденогипофиза и аденогипофизом при совместной инкубации с гипоталамусом, за счет изменения уровня циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) (A. D'Aniello et al., 2000; G. D'Aniello et al., 2000; E. Topo et al., 2009).

D-аспартат сам по себе или в присутствии хорионического гонадотропина (ХГЧ), за счет индукции экспрессии StAR, P450_{scc} и 3 β -HSD, усиливает продукцию андростендиона и тестостерона как в незрелых (F. Raucsi, A. D'Aniello, M.M. Di Fiore, 2014), так и в зрелых клетках Лейдига (Y. Nagata et al., 1999).

Исследование проведенное на первичной культуре клеток Лейдига мыши показало, что обработка одним только D-аспартатом не вызывает значительных изменений в высвобождении тестостерона или экспрессии белка рецептора ЛГ, однако добавление в культуральную среду ХГЧ значительно увеличивает экспрессию гена белка StAR и выработку тестостерона (A. Di Nisio et al., 2015).

D-аспартат вероятно влияет на ГГГО посредством воздействия на NMDA- и AMPA-типы глутаматных рецепторов. Показано, что NMDA-рецепторы экспрессируются в нейронах гипоталамуса секретирующих GnRH, а также в клетках секретирующих гормоны гипофиза (G.K. Bhat et al., 1995; M. Pampillo et al., 2002). Выявлено присутствие функционально активных глутаматных рецепторов в семенниках грызунов и человека (M. Storto et al., 2001).

В семенниках крыс D-аспартат индуцирует синтез тестостерона и усиливает экспрессию рецепторов андрогенов за счет активации NMDA-рецепторов (A. Santillo et al., 2014).

Краткосрочное воздействие D-аспартата на культуру клеток сперматогонии (линия GCI) активирует пролиферативный путь ERK / Aurora B через AMPAR (A. Santillo et al., 2015; A. Santillo et al., 2019).

Напротив, K. Tomita с соавт. показали, что при длительном культивировании (14-21 день) изолированного семенника мыши экзогенный D-аспартат подавляет дифференцировку зародышевых клеток за счет уменьшения количества митотических и мейотических клеток (K. Tomita et al., 2016).

Схематическое изображение механизма воздействия D-аспартата на ГГГО, стероидогенез и сперматогенез представлено на рисунке 1.2.2.

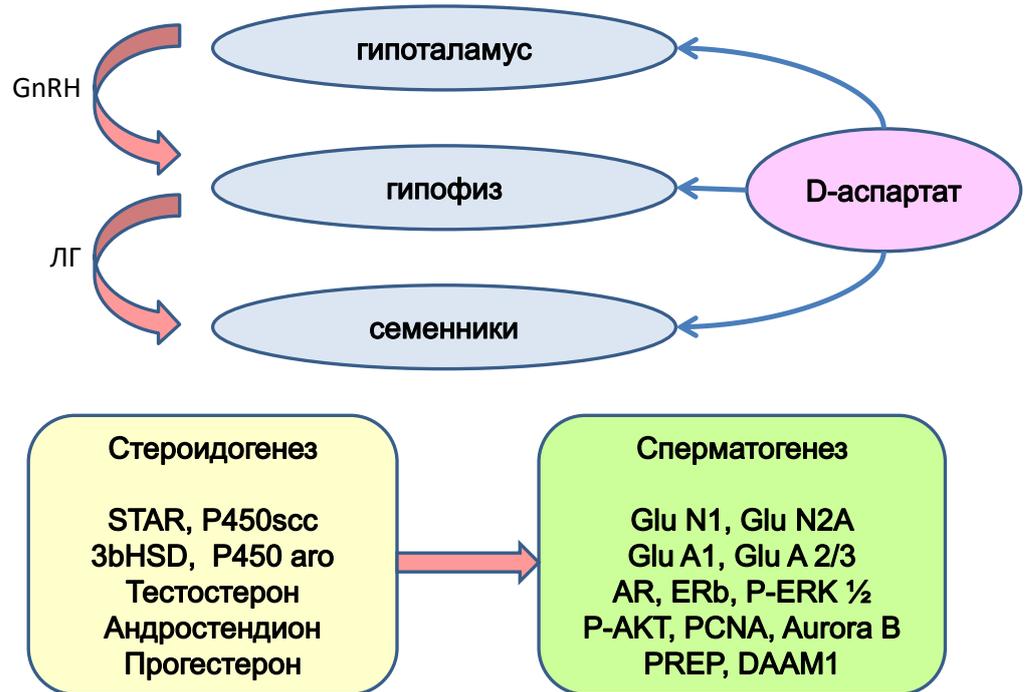


Рисунок 1.2.2 – Схематическое изображение механизма воздействия D-аспартата на ГГГО, стероидогенез и сперматогенез.

Вызывает высвобождение гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH), ЛГ и тестостерона; модулирует стероидогенез, повышая экспрессию StAR и стероидогенных ферментов – фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина P450 (P450scc), 3-гидроксистероиддегидрогеназа (3-HSD) и ароматаза цитохрома P450 (P450 aro). В семенниках активирует NMDA-рецепторы (субъединицы GluN1 и GluN2A) и AMPA (субъединицы GluA1 и GluA2/3). Усиливает экспрессию рецепторов андрогенов (AR) и эстрогенов (ER) и индуцирует пролиферацию сперматогониальных клеток за счет увеличения экспрессии PCNA и Aurora B через пути ERK и Akt. Повышает экспрессию PREP и DAAM1 (из Usiello A. et al., 2020 с изменениями)

Дополнительным подтверждением того, что D-аспартат играет активную роль в сперматогенезе, является увеличение экспрессии в семенниках крысы пролилэндопептидазы (PREP) (A. Santillo et al., 2019) и растрепанно-ассоциированного активатора морфогенеза-1 (DAAM1) (M. Venditti et al., 2020).

Эти два белка участвуют в ремоделировании цитоскелета, что представляется важнейшим аспектом сперматогенеза. Интересно, что применение экзогенного D-аспартата индуцировало повышение уровней белка DAAM1 в семенниках крыс, а также его миграцию из цитозоля в ядро половых клеток. Эксперименты на изолированных сперматозоидах мышей показали, что D-

аспартат улучшает общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов (M. Raspa et al., 2018; M. Raspa, R. Paoletti, E. Mahabir, F. Scavizzi, 2020).

Таким образом, при анализе доступных литературных источников можно сделать обоснованное заключение о том, что D-аспартат и D-аспарагин являются сигнальными молекулами, которые, в том числе, через воздействие на глутаматергическую систему, играют важную роль в развитии и функционировании нервной и эндокринной систем. Учитывая факт возможного влияния данных D-аминокислот на процессы трансляции белка (T. Fujino et al., 2013), недавние открытия глутаматных рецепторов на периферии (M. Vozic, J.M. Valdivielso, 2015), а также интегративную роль нейроиммунноэндокринной регуляции 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 и рубцевании.

1.3. Возможные механизмы, опосредующие влияние

D-аспартата и D-аспарагина на пролиферативную активность клеток

NMDA-тип глутаматных рецепторов играет важную роль во многих физиологических и патологических процессах за пределами ЦНС. Сообщается об экспрессии NMDA-рецепторов на множестве не-нейрональных клеток и тканей, в том числе в коже (A.D. Hogan-Cann, C.M. Anderson, 2016). Показана их роль в таких процессах как пролиферация, апоптоз, клеточная адгезия и миграция, перестройка актина, рост и дифференцировка клеток и регуляция секреции гормонов (M. Vozic, J.M. Valdivielso, 2015; A.D. Hogan-Cann, C.M. Anderson, 2016).

По данным W.K. Nahm и соавт., повреждение кожных покровов сопровождается поляризацией экспрессии NMDA-рецепторов (GluN1; GluN2A, B подтипы) в кератиноцитах, что приводит к ингибированию процесса

реэпителизации (W.K. Nahm et al., 2004). В то же время этими авторами показано, что клетки плоскоклеточного рака кожи лишены NMDA-рецепторов. 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 (W.K. Nahm et al., 2004). Таким образом, NMDA-рецепторы кожи могут служить фармакологической мишенью для модуляции поведения кератиноцитов при лечении патологии кожи (W.K. Nahm et al., 2004).

Полученные данные вызывают большой интерес, в связи с тем, что D-аспартат и D-аспарагин выявляются в коже грызунов и человека (и в других органах и биологических жидкостях) как в свободном состоянии, так и в составе белков (A. Hashimoto et al., 1993; A. Hashimoto, T. Oka, T. Nishikawa, 1995; S. Ritz-Timme et al., 2003; Y. Mori et al., 2011; Y. Xing, X. Li, X. Guo, Y. Cui, 2016; N. Fujii et al., 2018; V.V. Dyakin, T.M. Wisniewski, A. Lajtha, 2021).

Существуют работы, где показан стимулирующий эффект NMDA на пролиферативную активность первичной культуры кератиноцитов ротовой полости человека (I.S. Kim et al., 2006; I.S. Kim et al., 2007).

По данным Н.И.Чалисовой и А.Е. Коровина 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).

Ранее Н.И.Чалисовой исследовано влияние D-аминокислот на пролиферативную активность органотипических культур нервной, сердечно-сосудистой, мочеполовой, пищеварительной и иммунной систем крысы. Показано, что ни одна из исследуемых D-аминокислот (в том числе D-аспартат и D-аспарагин) в диапазоне концентраций от 0,01 до 10 нг/мл не влияла на

пролиферативную активность тканевых культур, индекс пролиферации во всех случаях оставался на уровне контроля (Н.И. Чалисова и др., 2013).

По данным К. Tomita с соавт., 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).

Показана 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). Применение D-аспартата сопровождалось ослаблением демиелинизации и стимулировало ремиелинизацию проводящих путей ЦНС у мышей с купризоновой моделью рассеянного склероза (V. De Rosa et al., 2018). Использование D-аспарагина у крыс с моделью спинального инсульта индуцированного фототромбозом сопровождалось торможением формирования глиального рубца в месте локализации повреждения спинного мозга (T. Chitanava et al., 2017).

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). 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).

Высказано предположение, что связывание D-аспартата с NMDA-типом глутаматных рецептором оказывает влияние на пролиферацию опухолевых клеток (W.G. North et al., 2010; A.D. Hogan-Cann, C.M. Anderson, 2016). Выявлена экспрессия и активность NMDA-рецепторов в биоптатах стромы и на 4 клеточных линиях рака простаты (M. Abdul, N. Hoosein, 2005).

Клетки рака молочной железы человека (линия *MCF-7*) содержат в 22 раза больше D-аспартата, 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-аспартатом (S. Du et al., 2019). Стимулирующее влияние D-аспартата и D-аспарагина на пролиферацию клеток, по-видимому, обусловлено воздействием на NMDA-рецепторы (S. Du et al., 2019).

NMDA-рецепторы участвуют в регуляции сигнальной активности mTOR, что является потенциальной терапевтической мишенью для контроля нерегулируемой пролиферации опухолевых клеток (S.I. Deutsch et al., 2014).

По данным В. Szende, 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). По данным N. Thomasset и соавт., D- и L-изомеры β -гидроксамата аспарагиновой кислоты *in vitro* показывают сопоставимую цитотоксическую активность при лейкемии мышей (линия *L5178Y*) (N. Thomasset et al., 1991).

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, данные D-аминокислоты являются оптическими изомерами L-аспартата и L-аспарагина (протеиногенные аминокислоты), то не исключается 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.

По предположению А. D'Aniello и соавт., антипролиферативный эффект D-аспартата и D-аспарагина обусловлен нарушением аминокислотного обмена за счет ингибирования специфических ферментов участвующих в обмене их L-форм, в частности аспаратаминотрансферазы (А. D'Aniello et al., 1993).

Аппарат клеточной трансляции синтезирует белки с использованием исключительно L- или ахиральных аминоксил-тРНК, несмотря на присутствие D-

аминокислот в живых организмах. Повсеместное присутствие преимущественно L-аминокислот в составе белков привело к гипотезе о том, что D-аминокислоты не являются субстратами для трансляции. Однако L-аминоацил-tРНК-синтетазы могут переносить D-аминокислоту на родственные tРНК, данной реакции противодействует фермент D-тирозил-tРНК деацилаза (S. Wydau et al., 2009). D-тирозил-tРНК деацилаза (D-аминоацил-tРНК деацилаза) отсоединяет D-аминокислоты присоединенные к tРНК (D-тирозин, D-триптофан, D-аспартат, D-серин и D-глутамат) и, таким образом, участвует в сохранении трансляции и поддержании гомохиральности белков (R. Calendar, 2017).

В исследованиях *in vitro* показано, что аппарат трансляции все же способен крайне медленно принимать D-аминоацил-tРНК в сайт связывания рибосомной аминоксил-тРНК, использовать их в качестве акцептора переноса пептидила и перемещать образовавшуюся пептидил-D-аминоацил-tРНК в рибосомный сайт связывания пептидил-tРНК. Однако, далее на рибосомах, несущих Р-сайт пептидил-D-аминоацил-tРНК, трансляция как правило блокируется (M.T. Englander et al., 2015).

По данным T. Fujino и соавт., D-аспартат и D-аспарагин относятся к группе аминокислот с использованием которых даже в модельных условиях, синтез длинноцепочечной полипептидной цепи практически невозможен или значительно затруднен (T. Fujino et al., 2013).

D-тирозил-tРНК деацилаза локализована в области оболочки ядра (ядерной поры) клеток млекопитающих. В экспериментах на клеточной линии *HeLa* обработка D-аминокислотами (D-тирозин, D-аспартат и D-серин) на фоне ингибирования D-тирозил-tРНК деацилазы приводила к дозозависимому подавлению белкового синтеза и снижала жизнеспособность клеток (G. Zheng et al., 2009).

Известно, что внутриклеточный L-аспарагин является критическим супрессором апоптоза во многих опухолях человека (J. Zhang et al., 2014). Во многих злокачественных образованиях наблюдается сниженная экспрессия аспарагинсинтетазы, из-за гиперметилирования промоторной области ее гена, а

опухоли с сохранной экспрессией имеют худший прогноз (Y. Ding, Z. Li, J.D. Broome, 2005).

Аспарагинсинтетаза превращает L-аспартат и L-глутамин в L-аспарагин и L-глутамат в АТФ-зависимой реакции. Исследования на культуре фибробластов человека показывают нарушение синтеза и стабильности белков, а также снижение пролиферативной активности клеток с мутациями гена аспарагинсинтетазы (C.L. Lomelino, J.T. Andring, R. McKenna, M.S. Kilberg, 2017).

Подавление функциональной активности аспарагинсинтетазы на фоне истощения пула L-аспарагина оказывает сильнейшее ингибирующее действие на рост саркомы мыши *in vivo* и человека *in vitro* (S. Hettmer et al., 2015).

L-аспарагин играет критическую роль в поддержке белкового синтеза в опухолевых клетках на фоне истощения пула глутамина (J. Jiang et al., 2018). Истощение внутриклеточного пула L-аспартата сопровождается падением уровня продукции L-аспарагина, подавляет mTORC1-зависимый синтез нуклеотидов и пролиферацию клеток на множестве моделей рака у мышей (A.S. Krall et al., 2016; L.V. Sullivan et al., 2018; G. Pathria et al., 2019; A.S. Krall et al., 2021). Таким образом, основываясь на важной роли L-аспарагина в процессах белкового синтеза и пролиферации, стоит рассмотреть возможную антагонистическую роль D-аспарагина и D-аспартата в данных процессах.

В физиологических условиях остатки L-аспартила и L-аспарагинила в белках спонтанно изомеризуются или рацемизируются до остатка D-аспартила или D,L-изоаспартила, что оказывает негативное влияние на их функциональную активность. Функционирование L-изоаспартил/D-аспартил-O-метил-трансферазы (PIMT), конвертирующей остатки L-изоаспартила и D-аспартила в L-аспартил, критично для процессов деления и дифференцировки клеток (E. Kim et al., 1999; M. Yamashita et al., 2018).

В экспериментах *in vitro* проведенных на клеточной линии *HEK293* с нокаутом PIMT показано снижение уровня мРНК, в белках накапливалось значительное количество остатков изоаспартила и происходили нарушения в работе MAP-киназного каскада (T. Furuchi et al, 2010; I. Sambri et al, 2011).

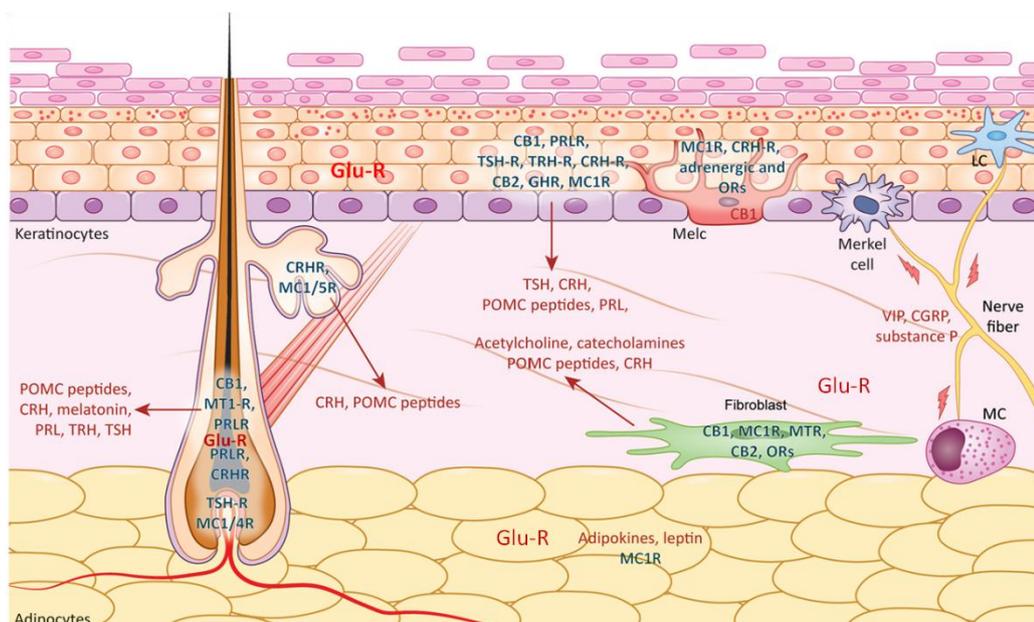


Рисунок 1.3.1 – Кожа как источник и цель нейроэндокринных медиаторов.

CB1 и CB2 – каннабиноидные рецепторы 1 и 2 типа; CGRP – кальцитониноген-родственный пептид; CRH – кортикотропин-рилизинг-гормон; CRHR – рецептор кортикотропин-рилизинг-гормона; GHR – рецептор гормона роста; LC – клетка Лангерганса, MC – тучная клетка; MelC – меланоцит; MT-1 – рецептор мелатонина 1 типа; OR – опиоидный рецептор; PRL – пролактин;

PRLR – рецептор пролактина;

TSH – тиреотропный гормон; TSH-R – рецептор тиреотропного гормона;

TRH – тиреотропин-рилизинг-гормон; TRH-R – рецептор тиреотропин-рилизинг-гормона; VIP – вазоактивный интестинальный полипептид

(из Ramot Y., Böhm M., Paus R., 2021 с изменениями).

В качестве дополнения, следует упомянуть о том, фактически, все элементы контролирующие активность оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники и ГГГО экспрессируются и в коже, включая GnRH, урокортин, ПОМК, АКТГ, α -МСГ, β -эндорфин (рисунок 1.3.1).

Демонстрация соответствующих рецепторов в одних и тех же клетках кожи предполагает их пара- и аутокринные механизмы действия. Эти данные, вместе с демонстрацией кожной продукции множества других гормонов позволяют говорить о коже с позиции концепции нейроэндокринного органа. Становится возможным экстраполировать данные полученные о влиянии D-аспартата в нейроэндокринной системе на кожу и предположить также наличие опосредуемого D-аспартатом влияния единой нейроиммуноэндокринной регуляции на пролиферативную активность клеток кожи и заживление ран (A. Slominski, J. Wortsman, 2000; Y. Ramot, M. Böhm, R. Paus, 2021).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

Исследование проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986; ред. Страсбург, 2006), с учетом международных правил «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – 8th edition, 2011». Протокол исследования одобрен на заседании независимого этического комитета на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России: протокол №85 от 28.01.2020 г. 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).

В качестве объекта исследования в работе задействованы:

- 1) первичная культура дермальных фибробластов человека;
- 2) белые нелинейные крысы (самцы) $n=60$, массой 272 ± 15 г.

2.2. Схема эксперимента

Исследование состоит из культуральной части выполненной на первичной культуре дермальных фибробластов человека (рисунок 2.2.1 А) и экспериментальной части проведенной на белых нелинейных крысах (рисунок 2.2.1 В).

Характеристика экспериментальных групп при проведении культуральных исследований на дермальных фибробластах человека представлена в таблице 2.2.1. Введение питательной среды с D-аспарагином в группах 1-8 осуществлялось после 24-х часов от момента посева культуры дермальных фибробластов человека (3 пассаж). По окончании заданного времени воздействия в группах 1-3 и 5-7 проводили смену питательной среды (без D-аспарагина), далее

продолжали культивирование дермальных фибробластов человека до 72 часов. Таким образом, как в контроле, так и в группах 1-8 продолжительность 3 пассажа составила 72 часа.

Таблица 2.2.1 – Культуральные исследования на дермальных фибробластах человека (3 серии экспериментов)

Группа	Время, час	Концентрация D-аспарагина в питательной среде, г/л
Группа 1	2	0,013
Группа 2	6	0,013
Группа 3	24	0,013
Группа 4	48	0,013
Группа 5	2	0,13
Группа 6	6	0,13
Группа 7	24	0,13
Группа 8	48	0,13
Контроль	72	полная питательная среда без D-аспарагина

После окончания 72-часового цикла культивирования проведены: определение пролиферативной активности, ХТТ-тест, цитологическое и иммуноцитохимические исследования, а также кариотипирование.

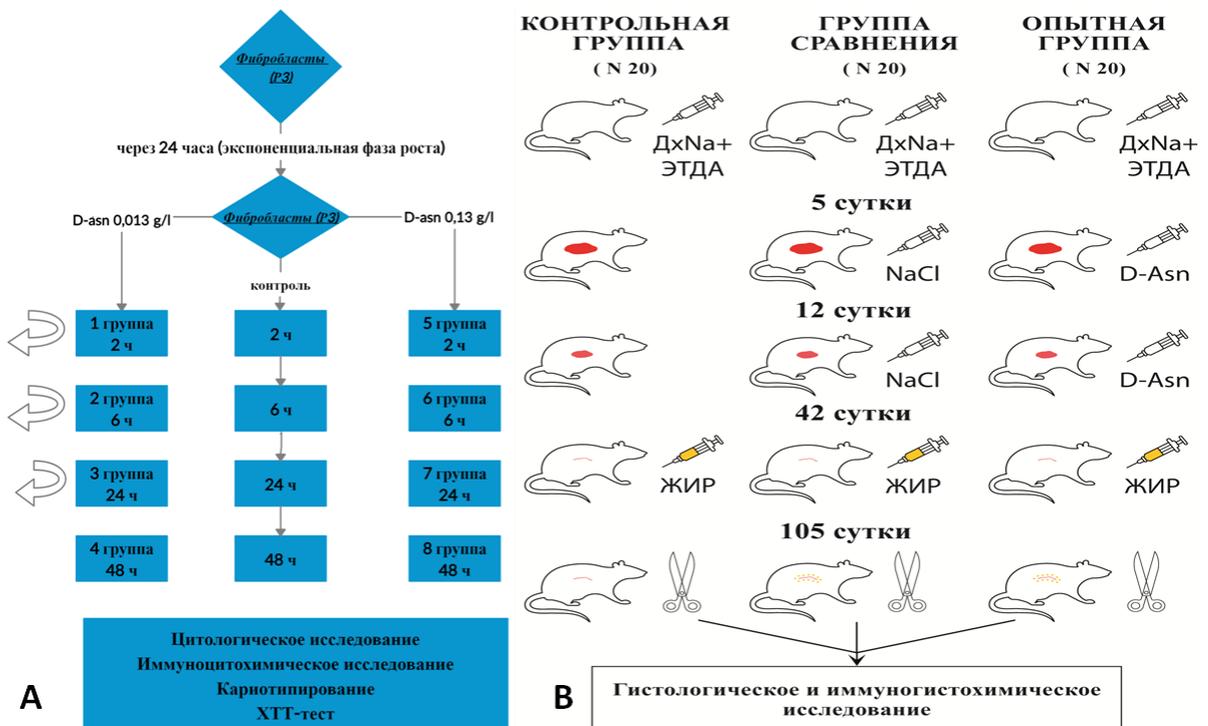


Рисунок 2.2.1 – Схема эксперимента:

- А) на дермальных фибробластах человека *in vitro*;
 Б) на модели дермального рубца у крыс *in vivo*.

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) – липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия на 5-е и 12-е сутки эксперимента;

группа 3 (опытная, n=20) – липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина на 5-е и 12-е сутки эксперимента.

На 42-е сутки эксперимента у всех животных из групп 1-3 проводили липофилинг, а на 105-е сутки (через 2 месяца после липофилинга) – забор кожи в зоне рубца для гистологического и иммуногистохимического исследования (рисунок 2.2.1 В).

Все вмешательства способные причинить животным боль и страдания (воспроизведение модели дермального рубца, липофилинг, забор кожи) проводились под «инъекционным» наркозом – телазол 20 мг/кг внутримышечно («Zoetis Inc.», США) и ксиланит 6 мг/кг внутримышечно («НИТА-ФАРМ», Россия) (А.М. Файн и др., 2019).

2.3. Модель дермального рубца

Предварительно, наркотизированным крысам выбривали шкуру на спине в зоне расположения дермального рубца, далее проводили последовательную обработку кожи 70% раствором этанола, и 1% раствором йодопирона. Воспроизведение модели дермального рубца выполняли путем внутрикожного введения в области спины 1 мл водного раствора содержащего 10% дезоксихолата натрия («Sigma Aldrich», США) и 0,5% К₂-ЭДТА («Вектон», Россия) (Ю.А. Сергеева и др., 2019). После проведения манипуляции, выполняли внутримышечную инъекцию антибиотика – бициллин-3 (ОАО «Белзооветснабпром», Беларусь) в дозировке 60 тыс. Ед/кг.



Рисунок 2.3.1 – Формирование папулы после внутрикожной инъекции 1 мл водного раствора содержащего 10% дезоксихолата натрия и 0,5% ЭДТА

Критерием качества проведенной манипуляции служило формирование отчетливой папулы непосредственно по завершении манипуляции (рисунок 2.3.1), на следующие сутки на ее месте появлялась четко различимая зона асептического некроза кожи, затем формировался язвенный дефект. У каждого животного проводился ежедневный осмотр раневого дефекта, фиксировалось время до наступления полной эпителизации раневого дефекта.

2.4. Методика забора липоасpirата и проведения липофилинга

Липоасpirат получен у пациентки А. 40 лет в ходе липоабдоминопластики выполненной по медицинским показаниям. Предварительно у донора получено добровольное информированное согласие на взятие и использование биоматериала.

Для получения липоасpirата и его обработки использовали метод S.R. Coleman & G.H. Carraway (S.R. Coleman, G.H. Carraway, 2002): липоасpirат собирали в области передней брюшной стенки с использованием двухканальной канюли для сбора Coleman с тупым концом (диаметр 3 мм), присоединенной к шприцу Luer-Lok объемом на 10 мл (Becton Dickinson, США) через 3-мм надрезы. Затем заполненные жиром шприцы помещали в центрифугу при 3000 об/мин в

течение 3 минут. После центрифугирования липоаспират разделялся на три слоя: верхний слой состоит из жировой эмульсии, средний слой представляет собой в основном жировую ткань, а внизу располагался водный слой. Далее, отделяли водный и масляный слои, для дальнейшего использования средний слой (жировая ткань) переносили в шприцы объемом 1 мл. Хранение и транспортировку забранной жировой ткани осуществляли в переносном холодильнике при +4⁰С.

Липофилинг крысам проводили на 42-е сутки эксперимента (в день забора липоаспирата у донора) путем подкожного введения 1 мл жировой фракции (липоаспират человека) в зоне кожного рубца крысы с помощью шприца с иглой 18G (V.D. Thanik et al., 2009).

Предварительно, введенным в состояние наркоза крысам выбривали шкуру на спине в зоне расположения дермального рубца, далее проводили последовательную обработку кожи 70% раствором этанола, 1% раствором йодопирона и снова 70% раствором этанола.

После проведения манипуляции, выполняли внутримышечную инъекцию антибиотика – бициллин-3 (ОАО «Белзооветснабпром», Беларусь) в дозировке 60 тыс. Ед/кг.

2.5. Методика выполнения забора кожи у крыс

Предварительно, за сутки перед забором биоматериала (104-е сутки эксперимента, 2 месяца после проведения липофилинга), выбривали кожу в зоне расположения дермального рубца.

На следующий день (105-е сутки эксперимента), наркотизированным крысам проводили обработку операционного поля 70% раствором этанола.

Затем хирургическими ножницами иссекали зону рубца с прилегающей здоровой кожей и подкожной клетчаткой в виде квадрата размерами 3,0х3,0 см.

Послеоперационная рана стягивалась и ушивалась ПГА нитью 4-0, далее выполняли обработку 1% раствором йодопирона, накладывали повязку и передавали животное в виварий.

2.6. Методики гистологического и иммуногистохимического исследования кожи крыс

Непосредственно после получения, образцы кожи ополаскивали в 0,9% растворе хлорида натрия, расправляли в гистологической кассете с подложкой и погружали в цинк-формалиновый фиксатор с сульфатом цинка на 48 часов (Z. Kmiec, J.A. Kiernan, 2016).

Далее выполняли проводку в парафин с использованием изопропанола и минерального масла. С помощью ротационного микротомы проводили нарезку парафиновых блоков на срезы с толщиной 4 мкм и монтировали их на предметные стекла.

Гистологическую окраску полученных микропрепаратов выполняли по протоколу для гематоксилин-эозина (с гематоксилином Гарриса), а также по Маллори-Слинченко (Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров, 2010).

Для проведения иммуногистохимического анализа, парафиновые срезы толщиной 4 мкм смонтированные на предметные стекла с силановым покрытием (МиниМед», Россия), подвергали стандартным процедурам депарафинизации и регидратации.

Все процедуры выполнены в строгом соответствии с протоколами производителей наборов. Вкратце, после этапа блокирования эндогенной пероксидазной активности, проводили тепловую демаскировку антигенов в цитратном буфере (pH 6,0), далее срезы кожи инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C с первичными поликлональными антителами (таблица 2.6.1). Комплекс антиген-антитело визуализировали диаминобензидин тетрагидрохлоридом (ДАВ-хромоген) при помощи соответствующих антивидовых вторичных антител и стрептавидин-биотиновой системы детекции согласно протоколам производителя.

Фоновое подкрашивание ядер на микропрепаратах проводили гематоксилином Джилла (Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров, 2010).

Таблица 2.6.1 – Первичные антитела для проведения иммуногистохимического исследования кожи

Антитело	Разведение	Производитель
anti-Collagen, Type I (COL1) antibody	1:100	Antibodies-online GmbH
anti-Allograft Inflammatory Factor 1 antibody	1:200	Bioss
anti-Vimentin antibody	1:100	Bioss
anti-APMAP antibody	1:200	Bioss
anti-Von Willebrand Factor antibody	1:300	Cloud-Clone

Окрашенные микропрепараты обезвоживали в ряду спиртов и заключали под покрывное стекло в синтетическую монтирующую среду.

Готовые гистологические и иммуногистохимические микропрепараты фотографировали с помощью окулярной камеры «Levenhuk M300 base» (США) на микроскопе Микромед-6 (Россия), полученные фотографии сохраняли в формате TIFF.

Для анализа сделанных фотографий применяли программу «Image J 1.51j8» (National Institute of Health, США). Предварительно, перед измерениями в программе проводили юстировку инструмента линейка (при увеличении объектива микроскопа, при котором сделана фотография), по объект-микрометру со шкалой деления 0,01 мм (ЛОМО, Россия).

Оценку содержания коллагена проводили на фотографиях микропрепаратов окрашенных по Маллори-Слинченко (10X увеличение объектива микроскопа), по 10 полям зрения в краевой зоне липографта и дерме (центр и периферия рубца), с помощью программы «Image J 1.51j8». Вкратце, после проведения деконволюции изображений с использованием плагина color_deconvolution2.jar (вектор для срезов с окрашиванием по Массон-трихром) проводили ручное выставление порога чувствительности, затем по заданному порогу определяли долю выделенной площади в процентах (J.H. Hong et al., 2020).

Оценку результатов иммуногистохимических исследований проводили на фотографиях, сделанных при 10X увеличении объектива микроскопа, по 10 полям зрения, с помощью программы «Image J 1.51j8». Вкратце, после проведения деконволюции изображений с использованием плагина color_deconvolution2.jar

(вектор для срезов с окрашиванием гематоксилин и DAB-хромоген), проводили ручное выставление 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 AIF-1 (клетки) и АРМАР (клетки) проводили автоматически с помощью инструмента анализ частиц в пересчете на 1 мм^2 , а содержание структур 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 фотографиях микропрепаратов окрашенных гематоксилин-эозином, сделанных соответственно при 10X и 4X увеличении объектива микроскопа по 10 точкам измерения в центральной зоне рубца с помощью инструмента линейка (Н. Khorasani et al., 2011).

На окрашенных гематоксилин-эозином микропрепаратах кожи в зоне рубца оценивали также следующие параметры (S.J. Hong et al., 2010):

- 1) сохранность адипоцитов (наличие интактных и ядродержащих адипоцитов);
- 2) наличие кист и вакуолей;
- 3) выраженность фиброза;
- 4) выраженность воспаления (по уровню инфильтрации липографта лимфоцитами и макрофагами).

Вышеперечисленные параметры оценивали по полуколичественной шкале от 0 до 5 баллов путем определения относительного присутствия каждого из них на исследуемом микропрепарате (С. Yi et al., 2006): 0 баллов – отсутствие; 1 балл – минимальная выраженность; 2 балла – от минимального до умеренного уровня; 3 балла – умеренный уровень; 4 балла – от умеренного до выраженного уровня; 5 баллов – чрезмерная выраженность показателя.

2.7. Протокол выделения дермальных фибробластов человека и ведения их первичной культуры

Первичная культура дермальных фибробластов человека выделена путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки 3-х кожных лоскутов площадью 10 см² (А. Takashima, 1998; В.Л. Зорин и др., 2014), забранных по медицинским показаниям в асептических условиях у взрослых доноров мужского пола. Предварительно у доноров получено добровольное информированное согласие на взятие и использование биоматериала.

Культуральная часть работы проводилась в CO₂-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 (10,000 Ед/мл пенициллин, 10,000 мкг/мл стрептомицин и 25 мкг/мл Амфотерицин В) (Thermo Fisher Scientific).

На 3 пассаже фибробласты, засеивались в 24-луночные и 96-луночные планшеты с плотностью посева 1500 кл/мл и в культуральные флаконы площадью 25 см² с плотностью посева 1,5×10⁵ клеток/см². Далее проводили культивирование клеток в течение 24 часов до их закрепления. Затем производили замену питательной среды на ту же, но с добавлением D-аспарагина (Sigma-Aldrich) в исследуемой концентрации 0,013 г/л (группы 1-4) и 0,13 г/л (группы 5-8). Культивирование фибробластов на питательной среде с D-аспарагином проводили в течение 2 (группа 1 и 5), 6 (группа 2 и 6), 24 (группа 3 и 7) и 48 часов (группа 4 и 8). После окончания времени воздействия проводили смену питательной среды на ту же, но без D-аспарагина и продолжали культивировать до достижения 72 часов с момента засеивания (в лунках с 48-часовым воздействием смену среды не проводили – группы 4-8). Контролем служили фибробласты, параллельно выращиваемые течение 72 часов без добавления D-аспарагина.

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.

2.8. Методика анализа пролиферативной активности клеток

Пролиферативную активность оценивали по среднему времени удвоения популяции фибробластов, по формуле (А. Korzynska, M. Zychowicz, 2008; Ф.А. Фадеев и др., 2016):

$$t = T / \log_2(N/N_0),$$

где «t» – среднее время удвоения популяции клеток, час;

«T» – время культивирования клеток, час;

«N» – плотность монослоя после культивирования, кл/см²;

«N₀» – плотность посева клеток, кл/см².

2.9. Методика анализа метаболической активности клеток

Метаболическую активность клеток оценивали согласно протоколу производителя, колориметрическим методом с использованием соли тетразолия ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид) (AppliChem, США) (М.В. Супотницкий и др., 2015). Оптическую плотность в опытных лунках сравнивали с оптической плотностью контрольных образцов (тремякратные измерения). Процент метаболически активных клеток в опытных образцах рассчитывали относительно контрольных образцов, приняв их за 100%. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США).

2.10. Методики цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека

Для проведения цитологических и иммуноцитохимических исследований использованы дермальные фибробласты человека из групп 1-8 и контроля

(каждой из 3 серий эксперимента), снятые трипсин-версеном, после окончания 72-часового цикла культивирования.

Для проведения кариотипирования, перед снятием клеток с культурального флакона площадью 25 см², их обрабатывали колхицином, а затем окрашивали по Романовскому-Гимзе (S. Vcelar et al., 2018).

Для составления морфологической характеристики клеток, цитологические микропрепараты окрашивали по Романовскому-Гимзе (без обработки колхицином).

Иммуноцитохимические исследования на виментин, p53 и Ki-67 проводили на цитологических микропрепаратах непрямым пероксидазным методом согласно протоколам из наборов производителя (Abcam). Использовали следующие первичные антитела (Rabbit Anti-Ki67 antibody; Mouse Anti-P53 antibody; Mouse Anti-Vimentin antibody) и вторичных антител (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP); Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)).

Комплекс антиген-антитело визуализировали перекисью водорода и диаминобензидин тетрагидрохлоридом (ДАВ-хромоген). Фотографии микропрепаратов выполнены с помощью окулярной камеры «Levenhuk M300 base» (США) на микроскопе Микромед-6 (Россия), при увеличении объектива микроскопа X100.

Оценка иммуноокрашивания проводилась полуколичественным методом, на 3 микропрепаратах из группы для каждого изучаемого антигена по 10 полям зрения.

Иммуноцитохимическая реакция к белку Ki-67 и к виментину оценивалась по полуколичественной шкале (от 0 до 4-х баллов): 0 баллов – отсутствует экспрессия; 1 балл – до 30%; 2 балла – 30-70%; 3 балла – 70-90%; 4 балла – 90-100%.

Иммуноцитохимическая реакция к белку p-53 проводилась качественным методом: «-» – цитоплазменная экспрессия (неспецифическая реакция); «+» – ядерная экспрессия (имеет диагностическую ценность).

2.11. Методы статистического анализа

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения «MS Excel 2010» (Microsoft, США), GraphPadPrism 7 (GraphPad Company, США) и «Statistica 13» (StatSoft Inc, США). Проверка на соответствие нормальному закону распределения количественных признаков в исследуемых группах проводилась с использованием критериев Шапиро-Уилка и Д'Агостино. 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. Динамика изучаемых показателей выражалась в виде разницы в процентах между числами. Разница между значениями показателей ХТТ-теста выражалась в виде расчета процента по отношению к контролю. В ходе изучения взаимосвязи между временем экспозиции в питательной среде с D-аспарагином и пролиферативной активностью фибробластов использовали коэффициент корреляции Спирмена, значение r оценивали по шкале Чеддока. Для оценки равенства дисперсий в исследуемых группах использовали критерий Левена. 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 $p \leq 0,05$ отклоняли нулевую гипотезу об отсутствии эффекта изучаемого вмешательства. Далее, 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Влияние D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека

3.1.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека

Как видно из таблицы 3.1.1, в ходе исследования выявлены существенные различия в показателях пролиферативной активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени экспозиции в питательной среде с содержанием 0,013 г/л D-аспарагина.

Таблица 3.1.1 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека (P3)

Группа	Время воздействия D-аспарагина, час	D-аспарагин 0,013 г/л		
		Среднее количество клеток $\times 10^3/\text{мл}$	Среднее количество клеток $\times 10^3/\text{см}^2$	Время удвоения популяции клеток (t)
1	2	212 \pm 40,28*	113,40 \pm 21,55*	13,08 \pm 2,40*
2	6	120 \pm 20,40#	64,20 \pm 10,90#	15,40 \pm 2,51#
3	24	81,70 \pm 12,26*	43,70 \pm 6,54*	17,50 \pm 2,62#
4	48	46,70 \pm 7,20*	25,00 \pm 4,15*	21,67 \pm 3,15*
Контроль	-----	110 \pm 17,71	58,80 \pm 9,47	15,80 \pm 2,54

Примечание: * – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета).

В группе 1 (2 часа), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 17,22% ($p=0,024$) сопровождающееся увеличением как их среднего количества/мл на 92,73% ($p=0,0001$), так и среднего количества/см² на 92,86% ($p=0,0001$), что свидетельствует об их крайне высокой пролиферативной активности.

В группе 2 (6 часов), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 2,53% ($p=0,727$) сопровождающееся увеличением как их среднего количества/мл на 9,1% ($p=0,257$), так и среднего количества/ см^2 на 9,2% ($p=0,253$), таким образом их пролиферативная активность практически не изменилась.

В группе 3 (24 часа), в сравнении с контролем, отмечено умеренное увеличение времени удвоения популяции фибробластов на 10,76% ($p=0,158$) сопровождающееся как уменьшением их среднего количества/мл на 25,73% ($p=0,0005$), так и среднего количества/ см^2 на 25,68% ($p=0,0006$), таким образом их пролиферативная активность имеет тенденцию к умеренному снижению. В группе 4 (48 часов), в сравнении с контролем, отмечено прогрессирующее увеличение времени удвоения популяции фибробластов на 37,16% ($p=0,0002$) сопровождающееся как уменьшением их среднего количества/мл на 57,55% ($p=0,0001$), так и среднего количества/ см^2 на 57,48% ($p=0,0001$), что указывает на крайне выраженное угнетение их пролиферативной активности.

Таким образом, между продолжительностью экспозиции дермальных фибробластов человека в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л и их пролиферативной активностью существует обратно пропорциональная зависимость. 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 ($p<0,05$).

3.1.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека

Как видно из таблицы 3.1.2, в ходе исследования также выявлены существенные различия в показателях пролиферативной активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени их экспозиции в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л.

Таблица 3.1.2 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека (P3)

Группа	Время воздействия, час	D-аспарагин 0,13 г/л		
		Среднее количество клеток $\times 10^3$ /мл	Среднее количество клеток $\times 10^3$ /см ²	Время удвоения популяции клеток (t)
5	2	140,00±26,50*	74,90±14,23*	14,70±2,27*
6	6	128,30±19,81*	68,70±10,91*	15,10±2,42#
7	24	108,30±12,99#	57,90±6,91#	15,90±1,87#
8	48	70,00±8,40*	37,40±4,45*	18,40±2,21*
Контроль	-----	110,00±15,73	58,80±8,41	15,80±2,26

Примечание: * – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета).

В группе 5 (2 часа), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 6,96% ($p=0,0112$) сопровождающееся увеличением как их среднего количества/мл на 27,27% ($p=0,0065$), так и среднего количества/см² на 27,4% ($p=0,0005$), таким образом их пролиферативная активность имеет тенденцию к умеренному росту.

В группе 6 (6 часов), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 4,43% ($p=0,512$) сопровождающееся увеличением как их среднего количества/мл на 16,64% ($p=0,035$), так и среднего количества/см² на 16,84% ($p=0,036$), таким образом их пролиферативная активность имеет незначительную тенденцию к росту.

В группе 7 (24 часа), в сравнении с контролем, время удвоения популяции фибробластов практически не изменилось – рост на 0,63% ($p=0,915$), отмечено незначительное уменьшение как их среднего количества/мл на 1,55% ($p=0,797$), так и среднего количества/см² на 1,53% ($p=0,795$), таким образом их пролиферативная активность не претерпела существенных изменений.

В группе 8 (48 часов), в сравнении с контролем, отмечено выраженное увеличение времени удвоения популяции фибробластов на 16,46% ($p=0,018$) сопровождающееся как уменьшением их среднего количества/мл на 36,36%

($p=0,0001$), так и среднего количества/см² на 37,1% ($p=0,0001$), что указывает на значительное угнетение их пролиферативной активности.

Таким образом, между продолжительностью экспозиции дермальных фибробластов человека в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л и их пролиферативной активностью существует обратно пропорциональная зависимость. 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 ($p<0,05$).

3.2. Влияние D-аспарагина на метаболическую активность дермальных фибробластов человека

3.2.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека

По результатам ХТТ-теста, как видно из таблицы 3.2.1, в ходе исследования выявлены существенные различия в метаболической активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени их экспозиции в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л.

В группе 1 (2 часа), метаболическая активность фибробластов по отношению к контролю незначительно снижена и составляет 95,4% ($p=0,159$).

В группе 2 (6 часов), метаболическая активность фибробластов по отношению к контролю также имеет тенденцию к снижению и составляет 92,3% ($p=0,007$).

В группе 3 (24 часа), данный показатель по отношению к контролю имеет значимую ($p=0,0001$) тенденцию к росту и составляет 105,7%.

В группе 4 (48 часов), метаболическая активность по отношению к контролю также имеет статистически значимую ($p=0,0001$) тенденцию к росту и составляет 109,2%.

Таблица 3.2.1 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека, в % по отношению к контролю

Группа	Время воздействия, час	D-аспарагин 0,013 г/л		
		Оптическая плотность, у.е. (Mean±SD)	ДИ±95%	ХТТ-тест, %
1	2	1,86±0,30#	1,60-2,11	95,4
2	6	1,80±0,25*	1,59-2,01	92,3
3	24	2,06±0,09*	1,98-2,14	105,7
4	48	2,13±0,05*	2,08-2,17	109,2
Контроль	-----	1,95±0,07	1,90-2,01	100

Примечание: * – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета).

Таким образом, по мере увеличения продолжительности экспозиции дермальных фибробластов человека в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л наблюдается тенденция к росту отношения их метаболической активности к контролю. 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 ($p < 0,05$).

3.2.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека

По результатам ХТТ-теста, как видно из таблицы 3.2.2, в ходе исследования выявлены существенные различия в метаболической активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени их экспозиции в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л.

Таблица 3.2.2 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на метаболическую активность дермальных фибробластов человека, в % по отношению к контролю

Группа	Время воздействия, час	D-аспарагин 0,13 г/л		
		Оптическая плотность (Mean±SD)	ДИ±95%	ХТТ-тест, %
5	2	1,84±0,32*	1,58-2,11	123,5
6	6	1,85±0,35*	1,56-2,14	124,2
7	24	2,03±0,09*	1,95-2,10	136,3
8	48	1,94±0,08*	1,88-2,00	130,2
Контроль	-----	1,49±0,70	0,91-2,07	100

Примечание: * – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета).

В группе 5 (2 часа), метаболическая активность фибробластов по отношению к контролю имеет тенденцию к росту и составляет 123,5% ($p=0,031$).

В группе 6 (6 часов) тенденция к росту сохраняется и составляет 124,2% ($p=0,029$).

В группе 7 (24 часа), показатель по отношению к контролю умеренно повышен ($p=0,0005$) и составляет 136,3%.

В группе 8 (48 часов), метаболическая активность по отношению к контролю также имеет статистически значимую ($p=0,003$) тенденцию к росту и составляет 130,2%.

Таким образом, по мере увеличения продолжительности экспозиции дермальных фибробластов человека в питательной среде с добавкой D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л намечается тенденция к росту отношения их метаболической активности к контролю. 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 ($p < 0,05$).

3.3. Влияние D-аспарагина на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека

3.3.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека

При цитологическом исследовании фибробластов, подвергнутых инкубации в среде с 0,013 г/л D-аспарагина, выявлено, что клетки сохранили характерную для фибробластов в открепленном состоянии морфологию – клетки округлой формы, размером около 20 мкм, с вакуолизированной и гранулированной цитоплазмой и эксцентричным расположением ядра (рисунок 3.3.1).

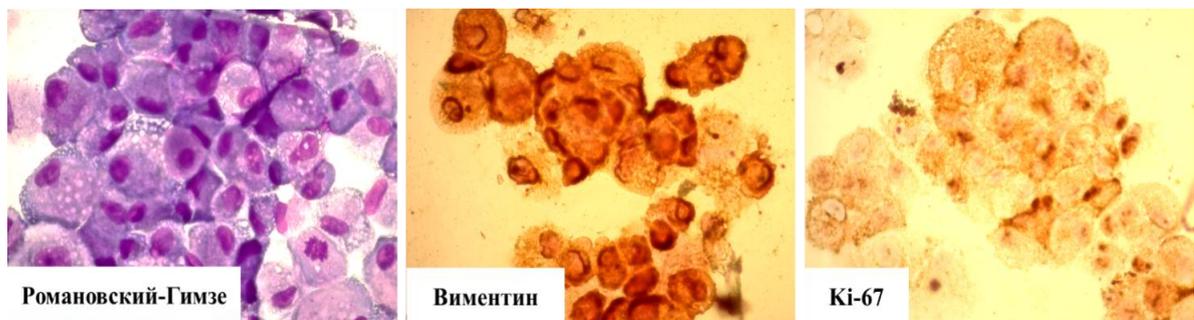


Рисунок 3.3.1 – Культура дермальных фибробластов человека, P3, культивированных с D-аспарагином (концентрация 0,013 г/л) в течение 2-х часов. Слева-направо: окраска Романовского-Гимзе; иммуноцитохимическая окраска на виментин; иммуноцитохимическая окраска на Ki-67 (окрашена суспензия клеток после их открепления трипсин-версеном, спустя 72 от начала цикла культивирования).

Стоит отметить, что в распластанном состоянии (на поверхности культуральной посуды) фибробласты имеют полигональную форму. По мере роста времени экспозиции в среде с D-аспарагином снижается число митотически активных клеток (с 4 в поле зрения в первой группе до 0 в 4 группе). При кариотипировании дермальных фибробластов человека, подвергнутых инкубации в среде с 0,013 г/л D-аспарагина в группах 1-4, как и в контроле, хромосомных aberrаций не выявлено.

При иммуноцитохимическом исследовании показано, что в группах 1-3 пролиферативный индекс, определенный по экспрессии маркера Ki-67, статистически значимых различий по сравнению с контролем не имеет (p_1 -

$p_{1-к}=0,643$; $p_{2-к}=0,222$; $p_{3-к}=0,120$; соответственно), тогда как в группе 4 наблюдается его падение до 2,3 баллов ($p_{4-к}<0,00001$).

Таблица 3.3.1 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л на результаты иммуноцитохимического исследования дермальных фибробластов человека

Группа	Время воздействия D-аспарагина, час	D-аспарагин 0,013 г/л		
		Виментин	Ki-67	P53
1	2	3,90±0,41#	3,85±0,37#	-
2	6	3,85±0,44#	3,75±0,44#	-
3	24	3,85±0,44#	3,70±0,47#	-
4	48	3,70±0,57#	2,30±0,86*	-
Контроль	-----	3,90±0,31	3,90±0,30	-

Примечание: * – при $p<0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p>0,05$, нулевая гипотеза об отсутствии различий, соответственно (post-hoc тест Даннета). Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67 и виментин оценивалась полуколичественно (от 0 до 4 баллов), а на белок p-53 качественно (наличие или отсутствие ядерной экспрессии).

В группах 1-4 отмечается высокий уровень экспрессии виментина (маркер фибробластов), статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено ($p_{1-к}=0,389$; $p_{2-к}=0,222$; $p_{3-к}=0,222$; $p_{4-к}=0,176$; соответственно). Также в группах 1-4, как и в контроле ни в одном случае не было обнаружено признаков ядерной экспрессии белка p53 (таблица 3.3.1; рисунок 3.3.1).

3.3.2. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на результаты цитологических и иммуноцитохимических исследований дермальных фибробластов человека

При цитологическом исследовании фибробластов, подвергнутых инкубации в среде с 0,13 г/л D-аспарагина, выявлено, что по мере роста времени экспозиции нарастает количество атипичных клеток (рисунок 3.3.2; таблица 3.3.2.1).

Таблица 3.3.2.1 – Динамика изменения морфологии дермальных фибробластов человека под влиянием D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л, окраска Романовского-Гимзе

Группа/время, ч	Описание микропрепарата
Группа №5 (2 часа)	выявлены единичные клетки размером около 30 мкм с центральным расположением ядра
Группа №6 (6 часов)	появляется большое количество реактивно измененных клеток, выявлены единичные случаи атипичного митоза, много укрупненных клеток, единичные дистрофичные и полиморфные клетки
Группа №7 (24 часа)	растет количество дегенеративных и реактивно измененных клеток, наблюдается умеренно выраженный полиморфизм клеток, выявлено множество двухъядерных клеток
Группа №8 (48 часов)	проявления клеточного атипизма нарастают, выявлено множество атипичных, дегенеративных и реактивно измененных клеток, ядра клеток неровной формы, единичные клетки с кариорексисом, выраженный полиморфизм клеток, множество двухъядерных клеток (рисунок 3.3.2).



Рисунок 3.3.2 – Культура дермальных фибробластов человека, P3, культивированных с D-аспарагином (концентрация 0,13г/л) в течение 48 часов. Слева-направо: окраска Романовского-Гимзе; иммуноцитохимическая окраска на виментин; иммуноцитохимическая окраска на Ki-67(окрашена суспензия клеток после их открепления трипсин-версеном, спустя 72 от начала цикла культивирования).

По мере роста времени экспозиции в среде с D-аспарагином снижается число митотически активных клеток (с 2-4 в поле зрения в группах 5-6 до 0 в группах 7-8). При кариотипировании дермальных фибробластов человека, подвергнутых инкубации в среде с 0,13 г/л D-аспарагина в группах 5-6, как и в

контроле, хромосомных aberrаций не выявлено. В группах 7-8 метафазных пластинок не обнаружено, что не позволяет судить о наличии хромосомных aberrаций.

При иммуноцитохимическом исследовании показано, что в группах 5-6 пролиферативный индекс, определенный по экспрессии маркера Ki-67, статистически значимых различий по сравнению с контролем не имеет ($p_{5-к}=0,120$; $p_{6-к}=0,176$; соответственно), тогда как в группах 7-8 наблюдается его падение до 3 и 1,35 баллов ($p_{7-к}=0,0003$; $p_{8-к}<0,00001$; соответственно) (таблица 3.3.2.1; рисунок 3.3.2).

В группах 5-6 отмечается высокий уровень экспрессии виментина, статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено ($p_{5-к}=0,9$; $p_{6-к}=0,177$). В группах 7-8 отмечается нарастающая тенденция к падению его экспрессии ($p_{7-к}<0,00001$; $p_{8-к}<0,00001$; соответственно). Также в группах 5-8, как и в контроле ни в одном случае не было обнаружено признаков ядерной экспрессии белка p53 (таблица 3.3.2.2; рисунок 3.3.2).

Таблица 3.2.2.2 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на результаты иммуноцитохимического исследования дермальных фибробластов человека

Группа	Время воздействия, час	D-аспарагин 0,13 г/л		
		Виментин	Ki-67	P53
5	2	3,90±0,31#	3,70±0,47#	-
6	6	3,90±0,58#	3,70±0,57#	-
7	24	3,15±0,59*	3,00±0,97*	-
8	48	1,90±0,62*	1,35±0,49*	-
Контроль	-----	3,90±0,31	3,90±0,31	-

Примечание: * – при $p<0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между опытными группами и контролем; # – при $p>0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета). Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67 и виментин оценивалась полуколичественно (от 0 до 4 баллов), а на белок p-53 качественно (наличие ядерной экспрессии).

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 может являться свидетельством того, что выявленные проявления клеточного атипизма не являются признаками онкогенного перерождения клеток.

3.4. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на результаты морфометрии кожи в зоне дермального рубца

3.4.1. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на толщину эпидермиса в зоне дермального рубца

При анализе результатов морфометрии зоны дермального рубца выявлено, что толщина эпидермиса в группе 1 (липофилинг) составляет $7,8 \pm 2,1$ мкм (таблица 3.4.1).

В группе 2 (физ. р-р+липофилинг) толщина эпидермиса составляет $9,6 \pm 3,2$ мкм, что на 28,57% больше, чем в группе 1 ($p=0,042$). В группе 3 (D-аспарагин+липофилинг) толщина эпидермиса составляет $5,4 \pm 1,6$ мкм, что на 44,4% меньше, чем в группе 2 ($p=0,000017$) и на 28,57% меньше, чем в группе 1 ($p=0,0032$) (таблица 3.4.1).

Таблица 3.4.1 – Толщина эпидермиса в центральной зоне кожного рубца спустя 2 месяца (на 63-сутки) после проведения липофилинга

Показатель, мкм	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (сравнения)	Группа 3 (опытная)
	эпидермис	эпидермис	эпидермис
Mean	7,8	9,6#	5,4*†
ДИ±95	6,8-8,8	8,1-11,1	4,6-6,1
SD	2,1	3,2	1,6
SE	0,47	0,7	0,36

Примечание: * и † – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p > 0,05$ принималась нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Тьюки).

При проведении однофакторного дисперсионного анализа для оценки влияния проведенного вмешательства на толщину эпидермиса, показано наличие выраженных межгрупповых различий между группой 3 (D-аспарагин+липофилинг) и группами 1 (липофилинг), 2 (физ. р-р+липофилинг) ($F=15,112$, $p=0,00001$) (рисунок 3.4.1.1).

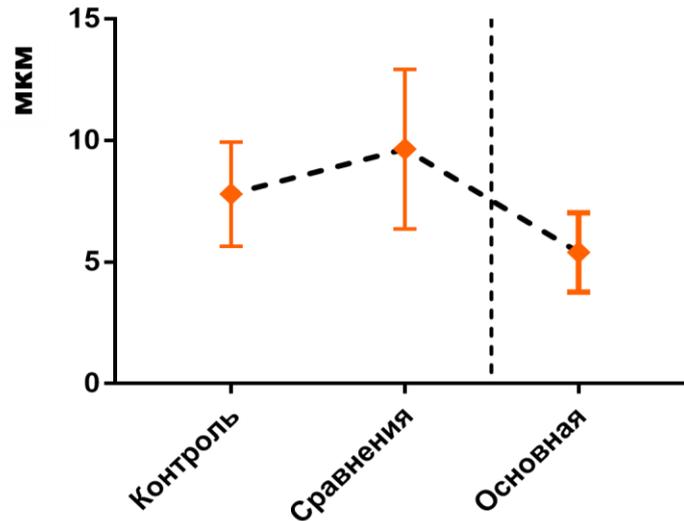


Рисунок 3.4.1.1 – Однофакторный дисперсионный анализ показывает влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином перед проведением липофилинга на толщину эпидермиса

При дальнейшем анализе результатов морфометрии центральной зоны дермального рубца с помощью post-hoc метода по Тьюки видно, что по толщине эпидермиса ДИ±95% в группе 1 и группе 2 полностью перекрывается, что наглядно свидетельствует об отсутствии значимых статистических различий между группами ($p>0,05$) (рисунок 3.4.1.2).

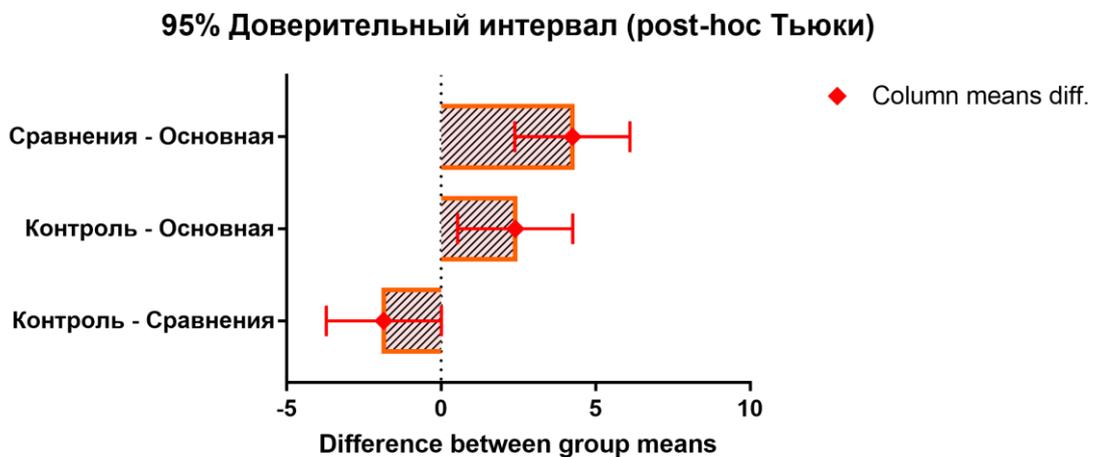


Рисунок 3.4.1.2 – Межгрупповые различия в толщине эпидермиса в зависимости от способа подготовки реципиентной зоны перед проведением липофилинга

В группе 3 (D-аспарагин+липофилинг) по толщине эпидермиса ДИ±95%, напротив, в значительной степени не совпадает с данными группы 2 (сравнения) и группы 1 (контроль), что наглядно подтверждает наличие статистически значимых различий между группами ($p=0,0001$) (рисунок 3.4.1.2).

Таким образом, применение D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга на рубцах сопровождается снижением толщины эпидермиса в центральной зоне патологического кожного рубца.

3.4.2. Влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином на толщину дермы в зоне дермального рубца

При анализе результатов морфометрии зоны дермального рубца выявлено, что толщина дермы в группе 1 (липофилинг) составляет $143,9 \pm 34$ мкм (таблица 3.4.2).

Таблица 3.4.2 – Толщина дермы в центральной зоне кожного рубца спустя 2 месяца (на 63-сутки) после проведения липофилинга

Показатель, мкм	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (сравнения)	Группа 3 (опытная)
	дерма	дерма	дерма
Mean	143,9	152,4#	117,1*†
ДИ±95	127,9-159,8	138,5-166,3	109-125,1
SD	34	29,6	17,1
SE	7,6	6,6	3,8

Примечание: * и † – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p > 0,05$ принималась нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Тьюки).

В группе 2 (физ. р-р+липофилинг) толщина дермы составляет $152,4 \pm 29,6$ мкм, что на 6,3% больше, чем в группе 1 (липофилинг) ($p=0,4$). В группе 3 (D-аспарагин+липофилинг) толщина дермы составляет $117,1 \pm 17,1$ мкм, что на 23% меньше, чем в группе 2 ($p=0,000067$) и на 5,9% меньше, чем в группе 1 ($p=0,0038$) (таблица 3.4.2).

При проведении однофакторного дисперсионного анализа для оценки влияния проведенного вмешательства на толщину дермы, показано наличие

выраженных межгрупповых различий между группой 3 (D-аспарагин+липофилинг) и группами 1 (липофилинг), 2 (физ. р-р+липофилинг) ($F=8,776$, $p=0,00048$) (рисунок 3.4.2.1).

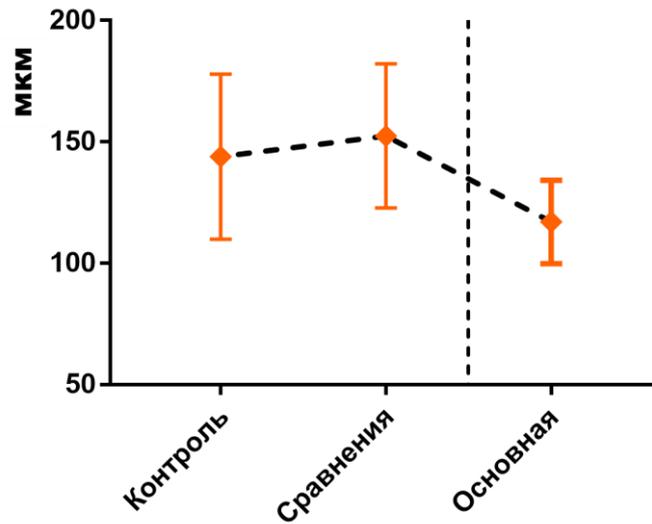


Рисунок 3.4.2.1 – Однофакторный дисперсионный анализ показывает влияние подготовки реципиентной зоны D-аспарагином перед проведением липофилинга на толщину дермы

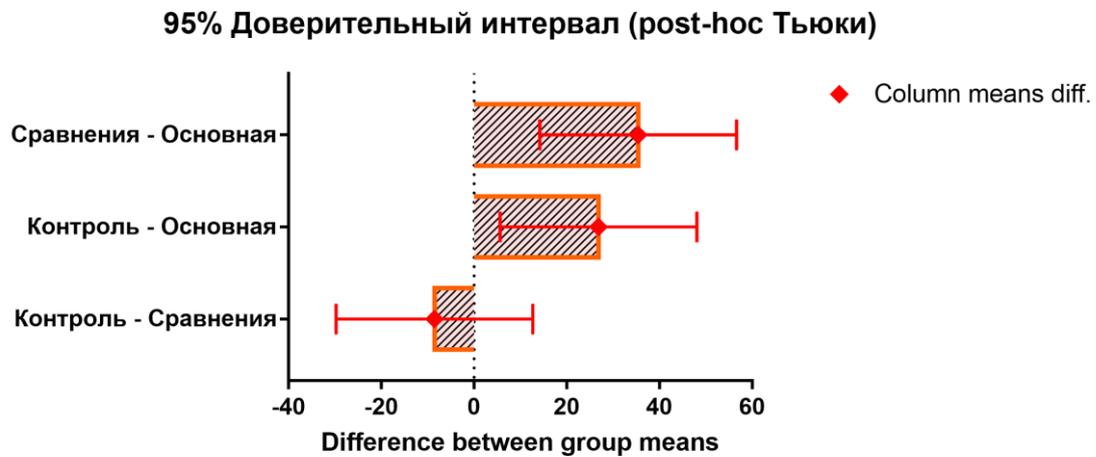


Рисунок 3.4.2.2 – Межгрупповые различия в толщине дермы в зависимости от способа подготовки реципиентной зоны перед проведением липофилинга

При дальнейшем анализе результатов морфометрии центральной зоны дермального рубца с помощью post-hoc метода по Тьюки видно, что по толщине дермы ДИ±95% в группе 1 (липофилинг) и группе 2 (физ. р-р+липофилинг) полностью перекрывается, что наглядно свидетельствует об отсутствии значимых статистических различий между группами ($p>0,05$) (рисунок 3.4.2.2).

В группе 3 (D-аспарагин+липофилинг) по толщине дермы ДИ±95%, напротив, в значительной степени не совпадает с данными группы 2 (сравнения) и группы 1 (контроль), что наглядно подтверждает наличие статистически значимых различий между группами ($p=0,0001$) (рисунок 3.4.2.2).

Таким образом, применение D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга на рубцах сопровождается снижением толщины дермы в центральной зоне патологического кожного рубца.

3.5. Результаты гистологического исследования кожи и липографта в зоне дермального рубца

В ходе забора кожи для проведения морфологических исследований у всех животных отмечено отсутствие оволосения в центральной зоне дермального рубца. При вырезке биоматериала отмечено, что в основной группе кожа мягче, чем в других. В группе сравнения и контроля, визуальнo кожные рубцы были с более грубой текстурой, жесткие при вырезке и более плотно сращены с подлежащими тканями.

При подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга показано, что в основной группе (применение D-аспарагина) продолжительность периода до 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 3.5.1).

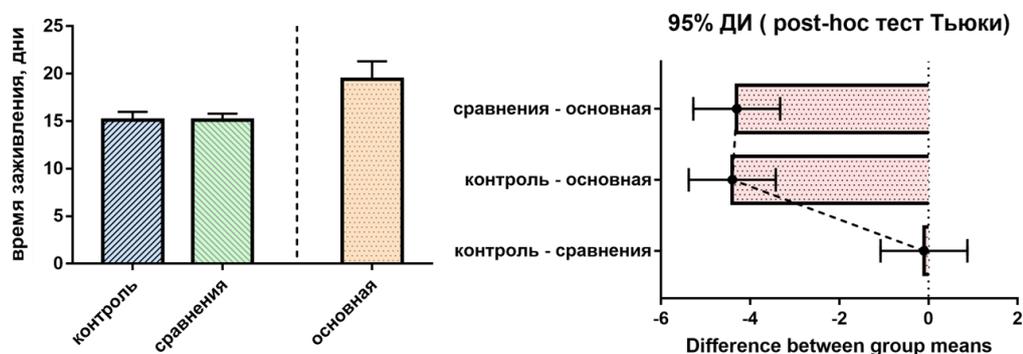


Рисунок 3.5.1 – Продолжительность периода до наступления полной эпителизации раневого дефекта при моделировании дермального рубца

При рассмотрении микропрепаратов окрашенных гематоксилин-эозином показано, что в центральной зоне рубцового дефекта отсутствуют волосяные фолликулы и сальные железы (за исключением 1 образца из основной группы с 5 сальными железами в п.з., рисунок 3.5.4 Е), что является характерным для кожных рубцов (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

При этом в краевой зоне рубца статистически значимых различий в содержании волосяных фолликулов и сальных желез не выявлено (рисунок 3.5.2), несмотря на тенденцию к большему числу сальных желез в основной группе (post-hoc тест Тьюки, $p > 0,05$) (рисунок 3.5.2 В).

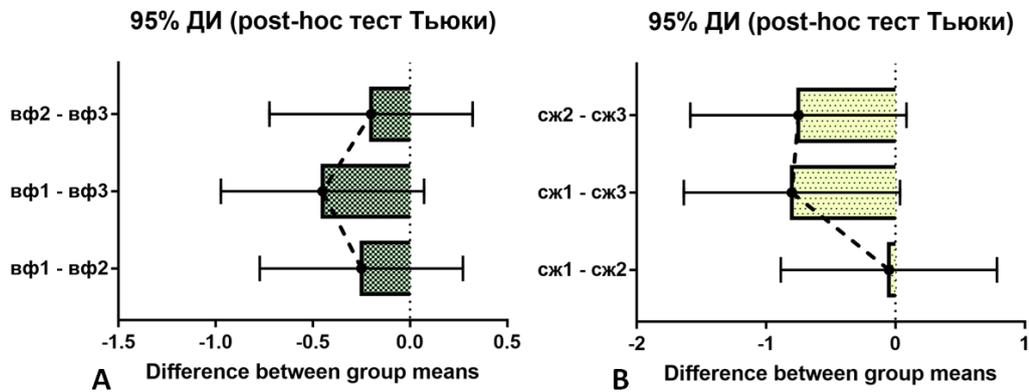


Рисунок 3.5.2 – Содержание волосяных фолликулов (А) и сальных желез (В) в краевой зоне дермального рубца, на 1 п.з.

При рассмотрении структуры эпидермиса отчетливо прослеживается его дифференциация на базальный, шиповатый, зернистый и роговой слои (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

Обращает на себя внимание, что в основной группе толщина эпидермиса и дермы несколько меньше, чем в группах сравнения и контроле. Граница перехода эпидермиса в дерму визуализируется отчетливо.

При этом в дерме в группах сравнения и контроле, в отличие от основной, практически полностью отсутствуют дермальные сосочки, разделение на сосочковый и сетчатый слои дермы не дифференцировано за счет фиброза и наличия липографта (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

В области базального и шиповатого слоев эпидермиса виден легкий диффузный спонгиоз и внутриклеточный отек клеток, что, однако может быть обусловлено особенностями гистологической фиксации (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

Также в дерме прослеживается большое количество крупных, с зияющим просветом (характерный для рубцов признак), переменных по диаметру сосудов, которые заполнены эритроцитами. Кровеносные сосуды отчетливо видны в периферической зоне липографта (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

При рассмотрении структуры дермы обращает на себя внимание характерная для рубцовой ткани горизонтальная ориентация коллагеновых волокон (для нормальной дермы характерна перекрестная), данный признак более выражен в группах сравнения и контроля, чем в основной группе (рисунок 3.5.3; 3.5.4).

Анализ состояния липографта на микропрепаратах окрашенных гематоксилин-эозином (рисунок 3.5.3; таблица 3.5.1) с использованием формализованных критериев (сохранность адипоцитов; наличие кист и вакуолей; выраженность фиброза; выраженность воспаления) по полуколичественной шкале (от 0 до 5 баллов), позволяет более точно оценить влияние проведенных вмешательств на его морфологию (S.J. Hong et al., 2010).

При оценке сохранности адипоцитов выявлено, что в основной группе показатель на 50% и 64,29% выше, чем в группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,388$; $p_{1-3}=0,000038$; $p_{2-3}=0,00001$).

На всех изученных микропрепаратах показано наличие кист, особенно в центральной зоне липографта, однако в основной группе показатель на 40,63% и 46,48% меньше, чем в группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,276$; $p_{1-3}=0,000053$; $p_{2-3}=0,000017$).

Отдельные признаки фиброзирования в краевой зоне липографта выявлены на всех микропрепаратах, однако в основной группе показатель на 31,82% и 40% меньше, чем в группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,128$; $p_{1-3}=0,0012$; $p_{2-3}=0,00001$).

Немаловажным признаком в целом успешного приживления жира является отсутствие инскапсуляции липоасpirата фиброзной тканью.

В связи с применением ксеногенной трансплантации липоасpirата (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 группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,055$; $p_{1-3}=0,00018$; $p_{2-3}=0,00001$).

Полученные результаты в целом свидетельствуют, несмотря на использование ксенотрансплантации (от человека крысе) инъецированный жир в целом приживается на выбранной модели, с легкими/умеренными признаками реакции отторжения.

Таблица 3.5.1 – Гистологическая оценка состояния липографта спустя 2 месяца после проведения липофилинга, по шкале от 0 до 5 баллов

Показатель, балл	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (сравнения)	Группа 3 (опытная)
Сохранность адипоцитов	2,30±0,86	2,10±0,55#	3,45±0,68*†
Наличие кист/вакуолей	3,20±0,83	3,55±1,15#	1,90±0,97*†
Выраженность фиброза	3,30±1,08	3,75±0,72#	2,25±0,78*†
Выраженность воспаления	2,95±0,68	3,40±0,75#	2,05±0,67*†

Примечание: * и † – при $p<0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p>0,05$ принималась нулевая гипотеза об отсутствии межгрупповых различий (post-hoc тест Тьюки).

Таким образом, 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.

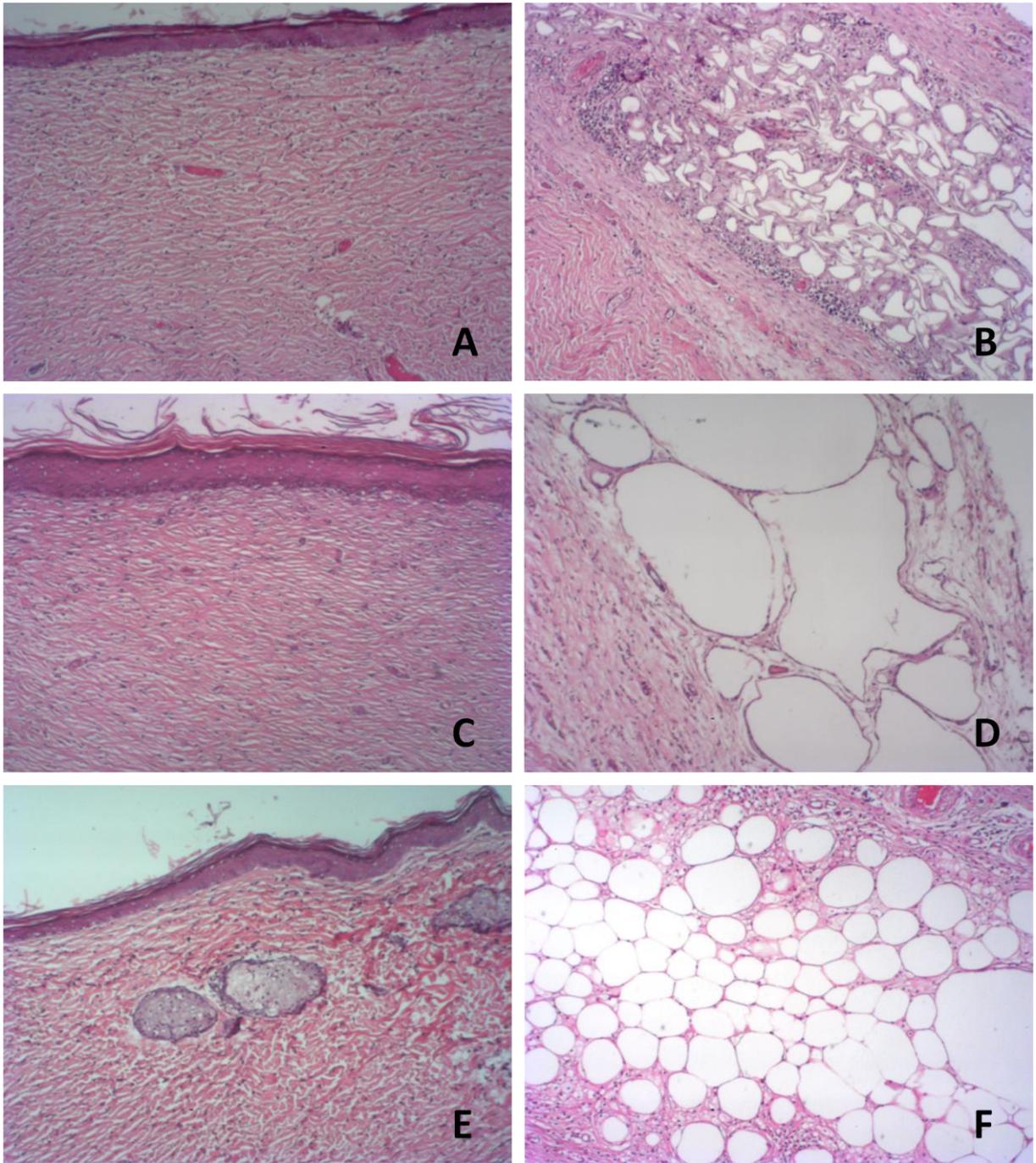


Рисунок 3.5.3 – Микропрепараты кожи в области дермального рубца через 2 месяца (63 дня) после проведения липофилинга. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 40$. А (эпидермис и дерма), В (липографт) – контрольная группа, липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; С (эпидермис и дерма), D (липографт) – группа сравнения, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия; Е (эпидермис и дерма), F (липографт) – основная группа, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина.

Анализ микропрепаратов окрашенных по Маллори-Слинченко (рисунок 3.5.4; таблица 3.5.2) 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 (рисунок 3.5.3).

Выявлено, что в основной группе содержание коллагена в дерме краевой зоны на 9,94% и 10,88% меньше, чем в группах сравнения и контроля соответственно ($p_{1-2}=0,61$; $p_{1-3}=0,00015$; $p_{2-3}=0,000006$).

В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание коллагена на 5,49% и 6,2% меньше, чем в группах сравнения и контроля соответственно ($p_{1-2}=0,177$; $p_{1-3}=0,0016$; $p_{2-3}=0,000065$).

При анализе содержания коллагена в краевой зоне липографта выявлено, что в основной группе на 14,07% и 18,59% меньше, чем в группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,054$; $p_{1-3}=0,00013$; $p_{2-3}=0,00001$).

Таким образом, в краевой зоне липографта, в дерме как центральной, так и краевой зоны рубца существуют статистически значимые ($p<0,05$) межгрупповые различия в содержании коллагена между основной группой (подготовка реципиентной зоны D-аспарагином) и группами сравнения и контроля.

Таблица 3.5.2 – Гистологическая оценка содержания коллагеновых волокон в краевой зоне липографта и в дерме (краевая и центральная зона) в области дермального рубца спустя 2 месяца (на 63-сутки) после проведения липофилинга, окраска Маллори-Слинченко

Коллаген, % на мм ²	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (сравнения)	Группа 3 (опытная)
Дерма, краевая зона	83,31±6,17	84,19±4,56#	75,03±6,31*†
Дерма, центральная зона	86,34±3,67	87,98±3,85#	81,60±5,06*†
Липографт	36,95±3,91	39,46±4,05#	31,75±3,84*†

Примечание: * и † – при $p<0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии межгрупповых различий; # – при $p>0,05$ принималась нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Даннета).

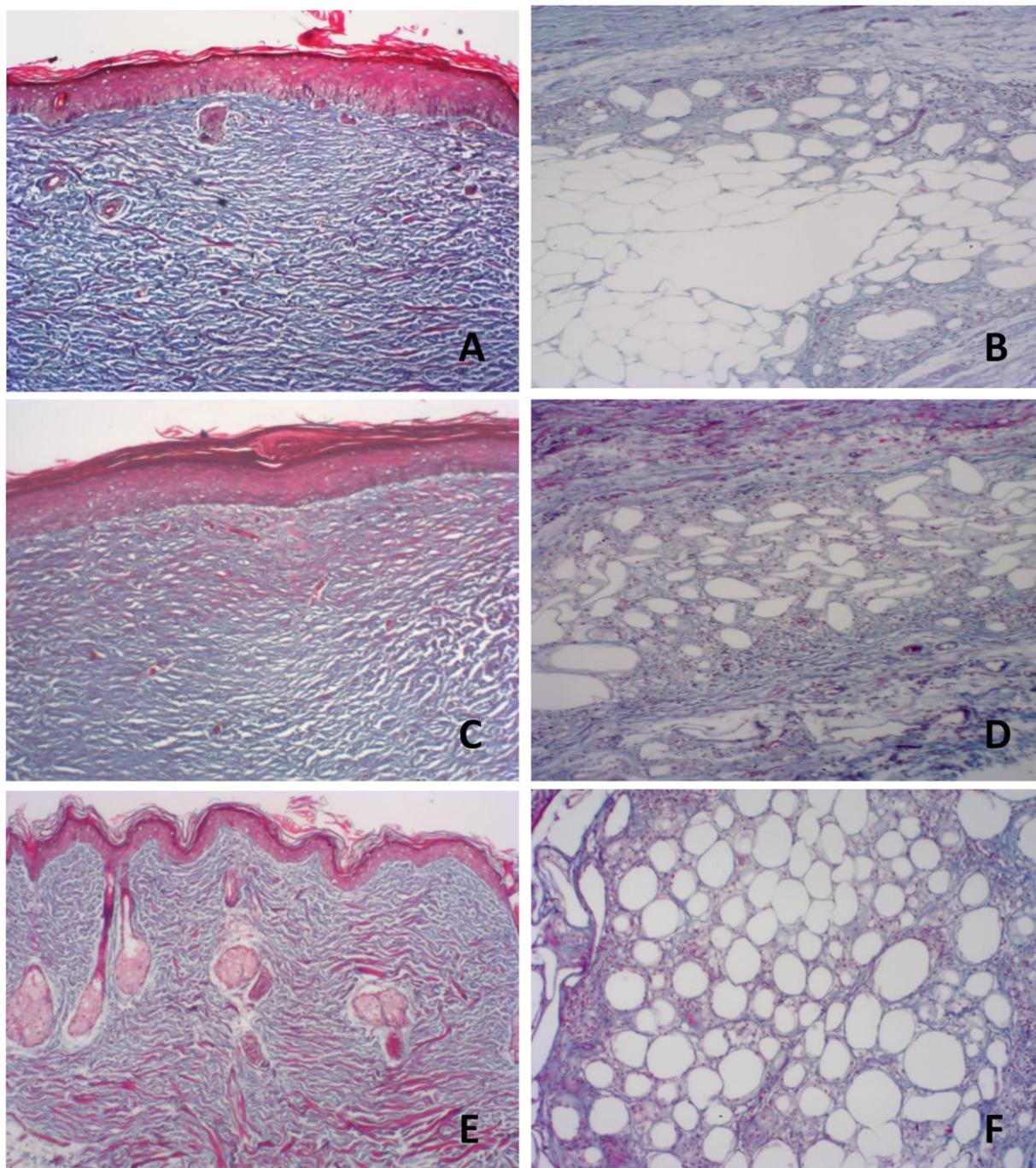


Рисунок 3.5.4 – Микропрепараты кожи в области дермального рубца через 2 месяца (63 дня) после проведения липофилинга. Окраска по Маллори-Слинченко, увеличение $\times 40$. А (эпидермис и дерма), В (липографт) – контрольная группа, липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; С (эпидермис и дерма), D (липографт) – группа сравнения, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия; E (эпидермис и дерма), F (липографт) – основная группа, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина.

3.6. Результаты иммуногистохимического исследования кожи и липографта в зоне дермального рубца

С целью более детальной характеристики влияния исследуемого способа подготовки реципиентной зоны на состояние дермы и липографта в области кожного рубца выполнено иммуногистохимическое исследование на такие показатели как, коллаген 1 типа, виментин, AIF-1, vWF и АРМАР (таблица 3.6.1; рисунок 3.6.1; 3.6.2; 3.6.3).

Таблица 3.6.1 – Результаты иммуногистохимического исследования липографта и дермы спустя 2 месяца (на 63-сутки) после проведения липофилинга

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (сравнения)	Группа 3 (опытная)
AIF-1 липографт, клеток/1 мм ²	23,55±6,72	23,40±4,08#	11,70±3,18*†
АРМАР липографт, клеток/1 мм ²	11,25±5,47	11,90±4,43#	18,55±5,52*†
vWF липографт, капилляров в п.з.	6,80±2,89	7,40±2,04#	12,10±2,40*†
Коллаген-1 липографт, % п.з.	22,80±9,42	26,45±8,58#	18,55±6,65#†
Виментин липографт, % п.з.	26,45±7,71	29,85±9,13#	23,05±9,80#†
Коллаген-1 дерма, % п.з.	53,20±6,91	52,70±7,61#	46,60±5,81*†
Виментин дерма, % п.з.	23,90±3,85	23,75±3,49#	23,10±9,96##

Примечание: * и † – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p > 0,05$ принималась нулевая гипотеза об их отсутствии (post-hoc тест Тьюки).

Выявлено, что в основной группе содержание коллагена 1 типа в краевой зоне липографта на 18,64% и 29,87% меньше, чем в группах контроля и сравнения соответственно ($p_{1-2}=0,377$; $p_{1-3}=0,269$; $p_{2-3}=0,014$).

В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание коллагена на 12,41% и 11,58% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,971$; $p_{1-3}=0,0093$; $p_{2-3}=0,017$).

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 ($p_{1-2}=0,455$; $p_{1-3}=0,456$; $p_{2-3}=0,0495$).

В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание виментина в основной группе на 3,35% и 2,74% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,997$; $p_{1-3}=0,919$; $p_{2-3}=0,946$).

Обращает на себя внимание, что в связи с особенностями ориентации соединительно-тканых волокон, в основной группе может определяться некоторое завышение уровня коллагена 1 типа и виментина, так как их содержание определялось как процент площади занимаемой DAB-хромогеном, по отношению к площади поля зрения.

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 ($p_{1-2}=0,7240$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,0001$).

Обращает на себя внимание, что содержание AIF-1 в краевой зоне липографта в основной группе на 50,32% и 50% меньше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,995$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,0001$).

При оценке содержания АРМАР в краевой зоне липографта выявлено, что в основной группе на 64,89% и 55,88% больше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,941$; $p_{1-3}=0,0013$; $p_{2-3}=0,0036$).

Полученные данные в целом свидетельствуют, о том, что подготовка реципиентной зоны D-аспарагином повышает активность ангиогенеза и выживаемость липоаспирата, снижает выраженность фиброза и воспалительной реакции в зоне, окружающей липографт.

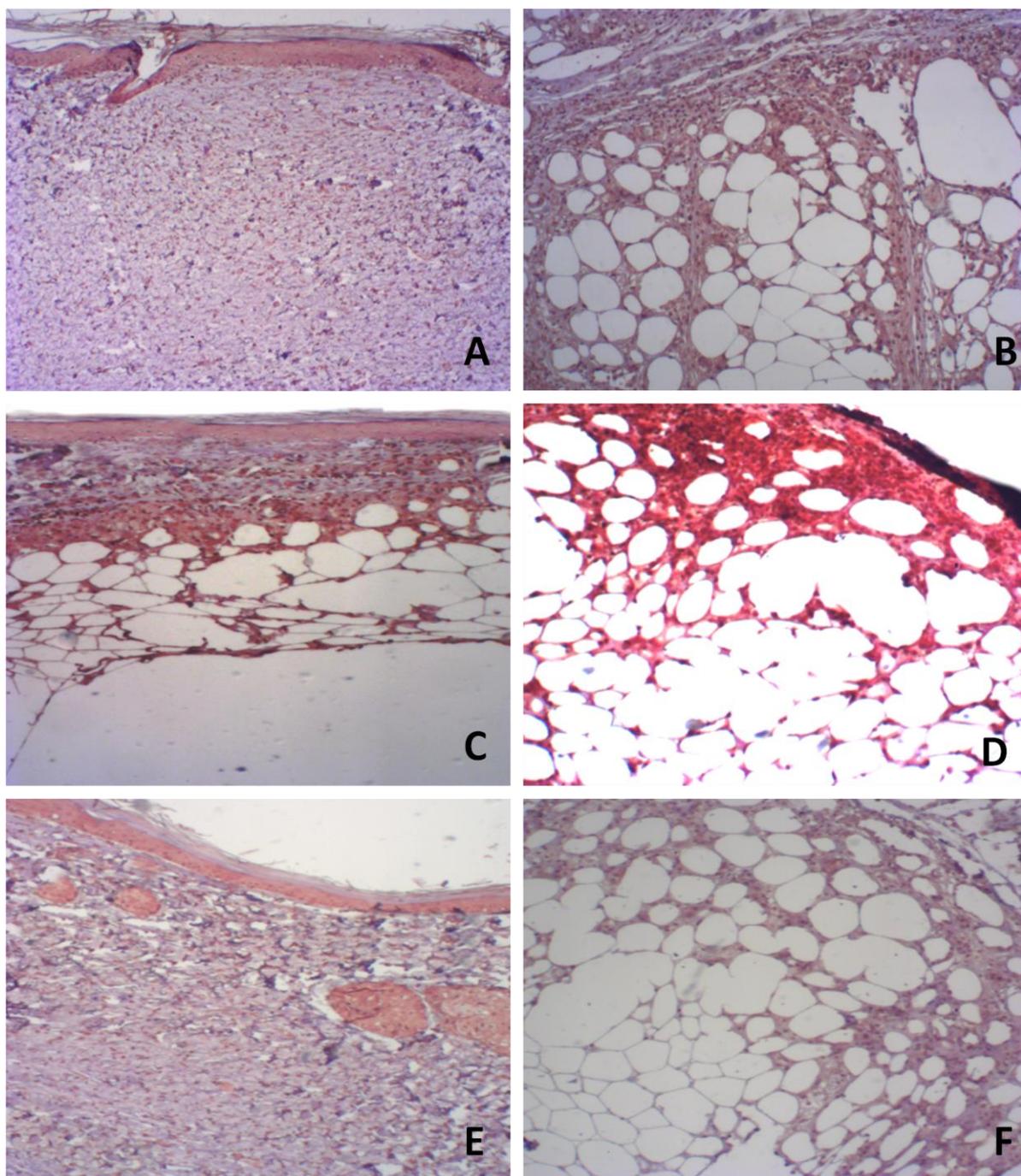


Рисунок 3.6.1 – Микропрепараты кожи в области дермального рубца через 2 месяца (63 дня) после проведения липофилинга. Иммуногистохимическая окраска на виментин (фоновое окрашивание проведено гематоксилином Джилла, визуализация антигена – DAB-хромоген), увеличение $\times 40$. А (эпидермис и дерма), В (липографт) – контрольная группа, липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; С (эпидермис и дерма), D (липографт) – группа сравнения, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия; Е (эпидермис и дерма), F (липографт) – основная группа, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина.

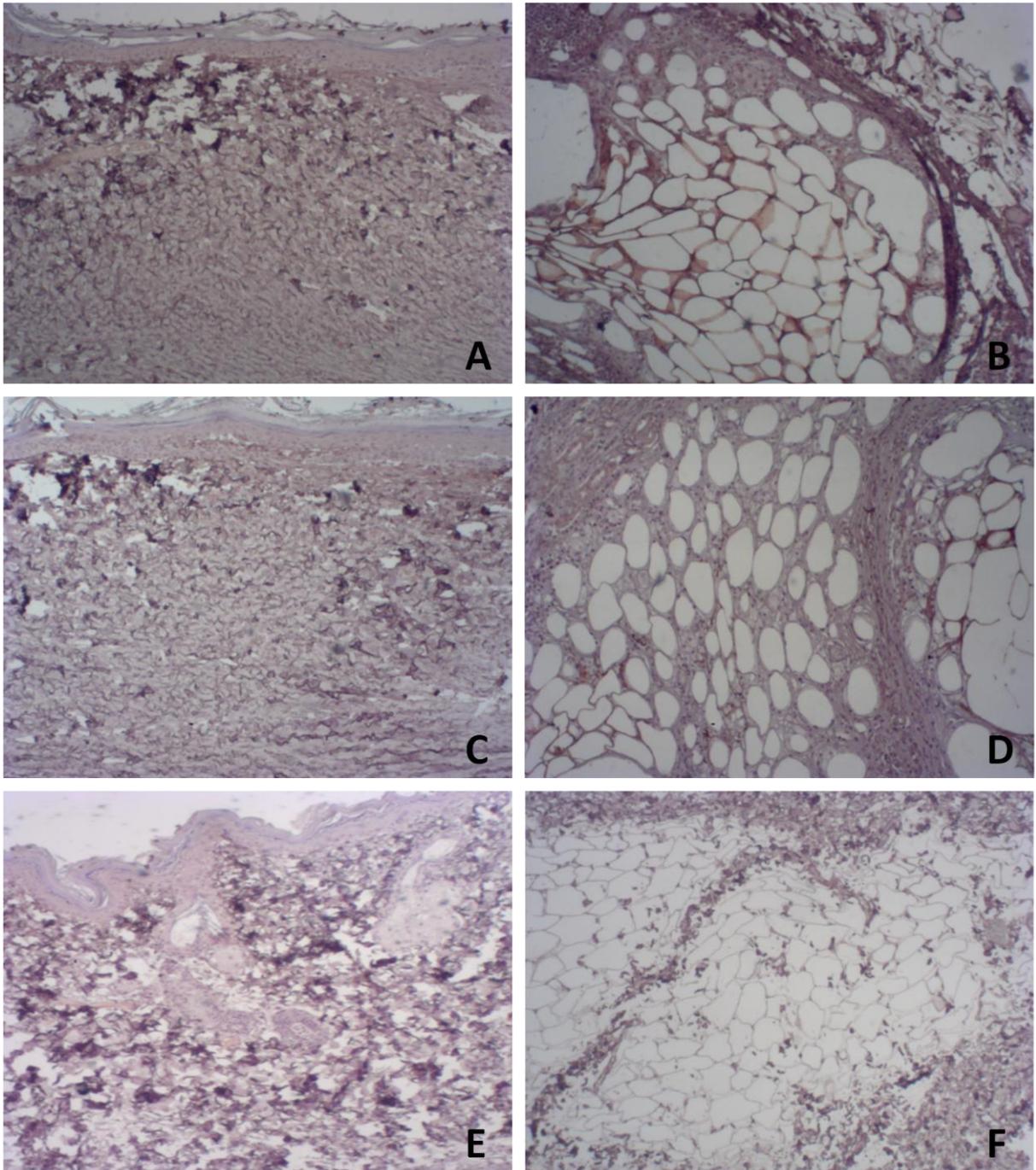


Рисунок 3.6.2 – Микропрепараты кожи в области дермального рубца через 2 месяца (63 дня) после проведения липофилинга. Иммуногистохимическая окраска на коллаген 1 типа (фоновое окрашивание проведено гематоксилином Джилла, визуализация антигена – DAB-хромоген), увеличение $\times 40$. А (эпидермис и дерма), В (липографт) – контроль, липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; С (эпидермис и дерма), D (липографт) – группа сравнения, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия; Е (эпидермис и дерма), F (липографт) – основная группа, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина.

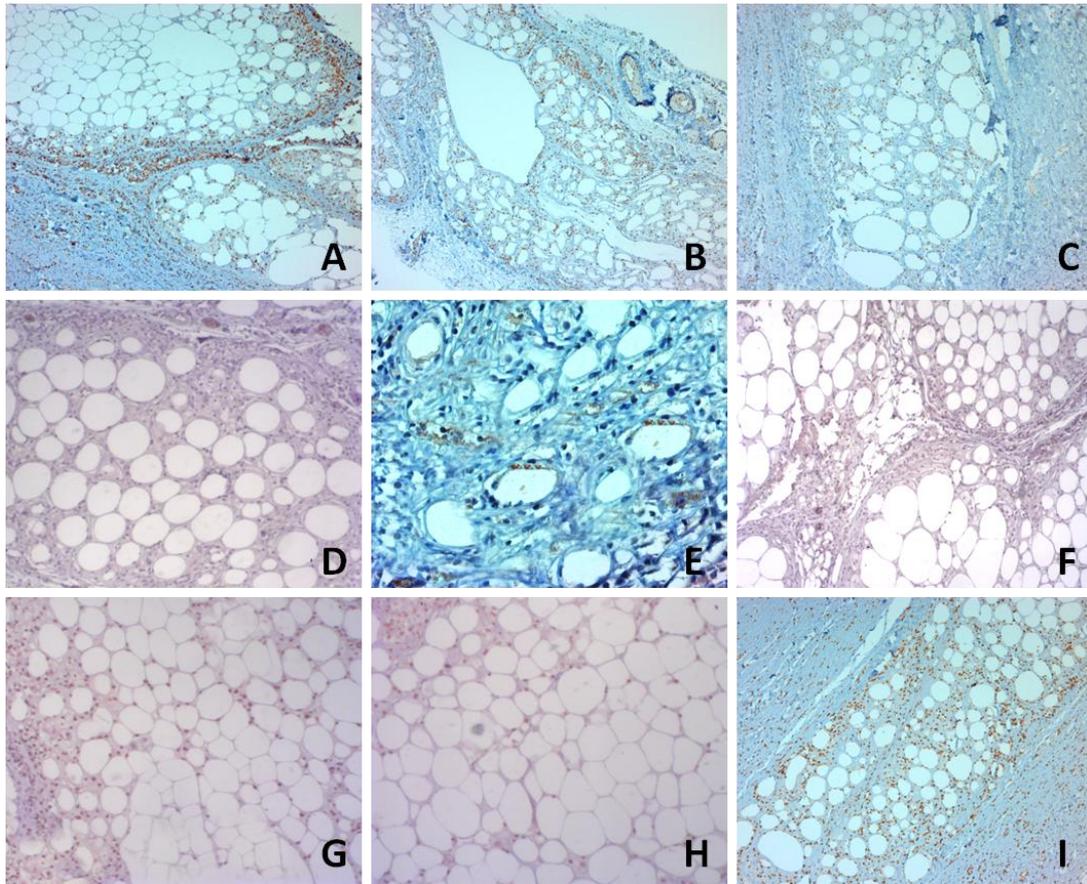


Рисунок 3.6.3 – Микропрепараты кожи в области дермального рубца через 2 месяца (63 дня) после проведения липофилинга, в поле зрения зона липографта. Иммуногистохимическая окраска на AIF-1 (A, B, C), фактор фон Виллебранда (D, E, F) и APRM (G, H, I), фоновое окрашивание проведено гематоксилином Джилла, визуализация антигена – DAB-хромоген, увеличение $\times 40$. A, D, G – контрольная группа, липофилинг на модели дермального рубца без предварительной подготовки тканей; B, E, H – группа сравнения, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,9% хлорида натрия; C, F, I – основная группа, липофилинг на модели дермального рубца с предварительным введением 0,5% водного раствора D-аспарагина.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 и 0,13 г/л на первичную культуру дермальных фибробластов человека

В ходе исследования выявлены существенные различия в показателях пролиферативной активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени экспозиции и используемой концентрации D-аспарагина (рисунок 4.1.1).

Полученные данные вызывают большой интерес в связи с тем, что D-аспарат и D-аспарагин выявляются в коже грызунов и человека (и в других органах и биологических жидкостях) как в свободном состоянии, так и в составе белков (A. Hashimoto et al., 1993; A. Hashimoto, T. Oka, T. Nishikawa, 1995; S. Ritz-Timme et al., 2003; Y. Mori et al., 2011; Y. Xing, X. Li, X. Guo, Y. Cui, 2016; N. Fujii et al., 2018; V.V. Dyakin, T.M. Wisniewski, A. Lajtha, 2021).

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 4.1.1).

Так в группах 1 и 5 (2 часа), в сравнении с контролем, отмечено сокращение времени удвоения популяции фибробластов на 17,22% и 6,96% ($p=0,024$; $p=0,0112$), учитывая то, что динамика данного показателя отражает логарифмическую зависимость, полученные данные свидетельствуют о крайне высокой пролиферативной активности клеток (рисунок 4.1.1).

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% ($p=0,0002$; $p=0,0001$), что указывает на крайнюю степень угнетения пролиферативной активности (рисунок 4.1.1).

При этом в группах 2, 6 (6 часов) и 3, 7 (12 часов), по мере роста времени экспозиции отмечается плавное уменьшение пролиферативной активности клеток, в связи с этим, по данному показателю статистически значимых различий с контролем не получено ($p > 0,05$) (рисунок 4.1.1).

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 ($p < 0,05$).

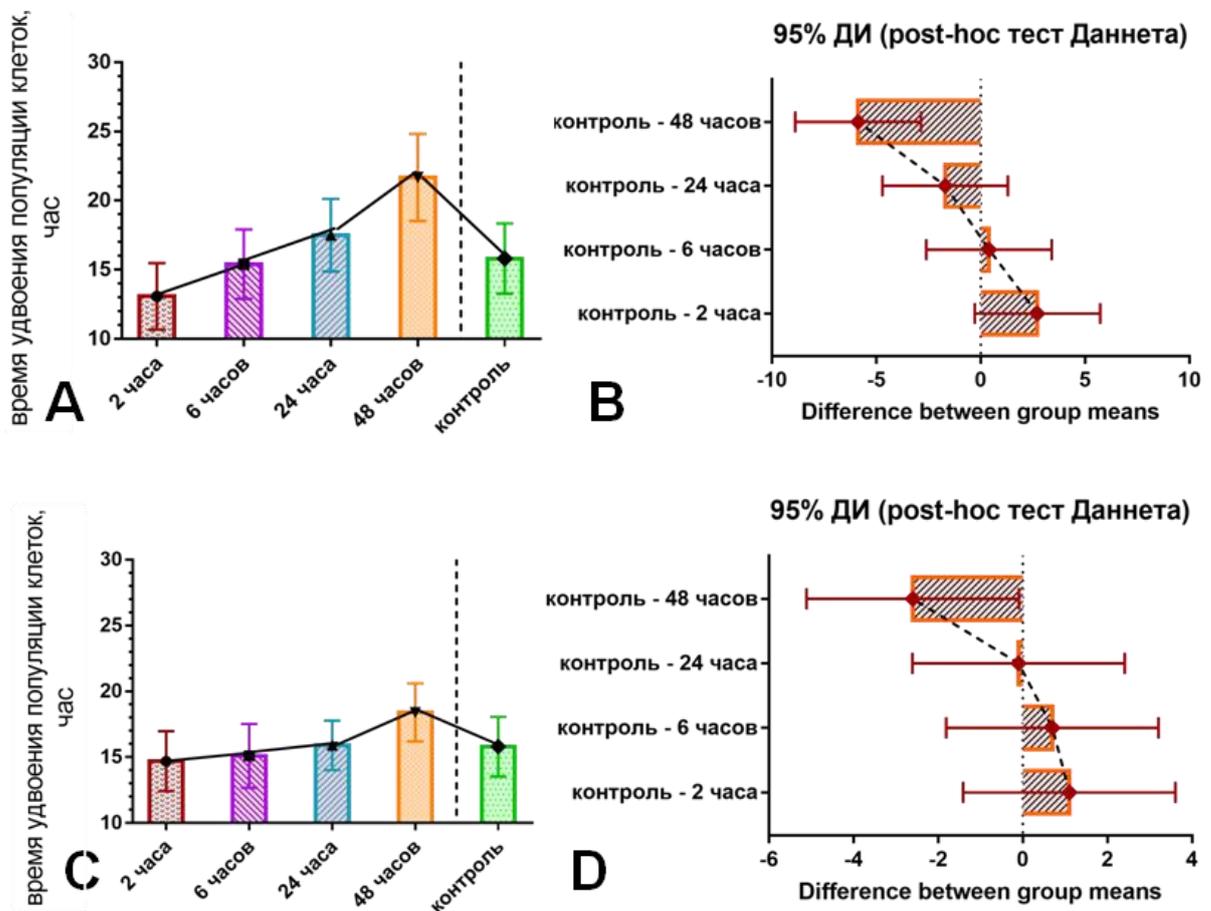


Рисунок 4.1.1 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, В) и 0,13 г/л (С, D) на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека, попарные сравнения групп 1-4 и 5-8 с контролем (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета).

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, о чем косвенно свидетельствует прогрессирующее снижение их пролиферации по мере роста времени экспозиции и концентрации D-аспарагина.

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).

По данным К. Tomita с соавт., 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).

По данным В. Szende, 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 (S. Wydau et al., 2009; G. Zheng et al., 2009; T. Fujino et al., 2013; M.T. Englander et al., 2015),

посттрансляционная модификация и изменение функционирования белков (E. Kim et al., 1999; T. Furuchi et al., 2010; I. Sambri et al., 2011; M. Yamashita et al., 2018; V.V. Dyakin, T.M. Wisniewski, A. Lajtha, 2021) и конкуренция за места связывания и ингибирование ферментов участвующих в обмене их L-форм (A. D'Aniello et al., 1993), на что указывает ключевая роль L-аспарагина для поддержания пролиферации нормальных (C.L. Lomelino, J.T. Andring, R. McKenna, M.S. Kilberg, 2017) и опухолевых клеток (Y. Ding, Z. Li, J.D. Broome, 2005; 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 и полученные результаты можно выдвинуть гипотезу о возможном влиянии D-аспартата и D-аспарагина на жизнедеятельность и, как следствие, пролиферацию практически всех типов соматических клеток млекопитающих.

По результатам ХТТ-теста, в ходе исследования также выявлены различия в метаболической активности дермальных фибробластов человека (P3) в зависимости от времени экспозиции и исследуемой концентрации D-аспарагина (рисунок 4.1.2).

Показано, что в целом 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 4.1.2).

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).

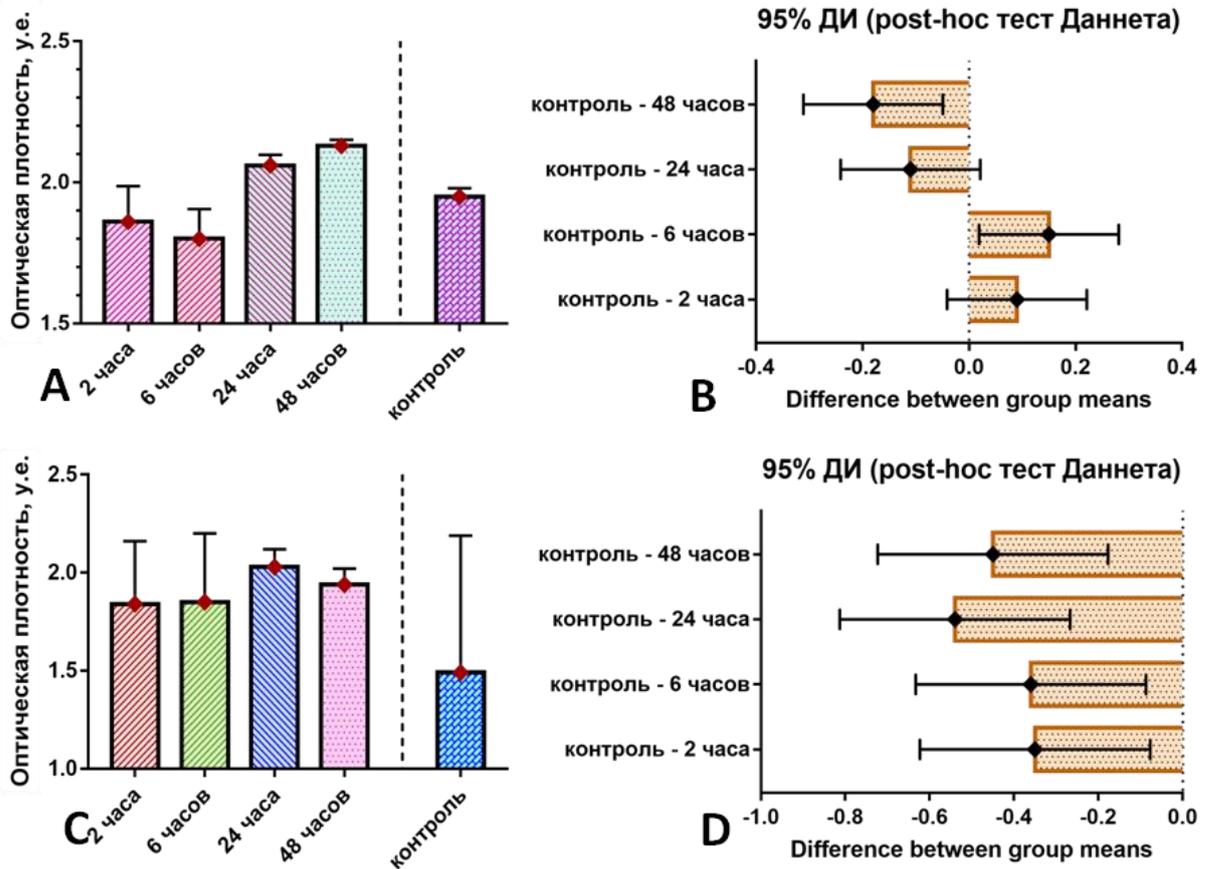


Рисунок 4.1.2 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, В) и 0,13 г/л (С, D) на метаболическую активность дермальных фибробластов человека, попарные сравнения групп 1-4 и 5-8 с контролем (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета).

При анализе данных цитологического и иммуноцитохимических исследований фибробластов (рисунок 4.1.3) подтверждаются результаты, полученные при оценке времени удвоения популяции дермальных фибробластов человека (рисунок 4.1.1).

Согласно данным цитологического исследования микропрепаратов фибробластов четко 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 4.1.2) 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 ($p_{4-к} < 0,00001$; $p_{8-к} < 0,00001$), соответственно (рисунок 4.1.3).

При цитологическом исследовании фибробластов, подвергнутых инкубации в среде с 0,13 г/л D-аспарагина – группы 5-8 (в отличие от 0,13 г/л D-аспарагина в группах 1-4), выявлено, что по мере роста времени экспозиции и 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-аспартата, 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-аспартатом (S. Du et al., 2019). Накопление D-аспартата 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 (ингибирует активность циклинзависимых киназ пролиферирующих клеток), что в целом свидетельствует против данной гипотезы (T. Lin et al., 2019).

Клеточное старение, термин, первоначально использовавшийся для определения характеристик нормальных человеческих фибробластов, достигших

своего репликативного предела, является важным фактором возрастных заболеваний, включая рак и перепрограммирования клеток. Эти исходы опосредованы связанными со старением изменениями в экспрессии генов, которые приводят к секреции провоспалительных факторов и способствуют парадоксальным проонкогенным эффектам p53. Показано, что некоторые изоформы белка p53 могут модулировать экспрессию генов вне зависимости от наличия полноразмерного p53 (K. Fujita, 2019).

Подавление экспрессии Notch усиливает старение первичных фибробластов дермы, слизистой оболочки полости рта, груди и легких, что на фоне подавления гена *p53* стимулирует размножение раково-ассоциированных фибробластов (M.G. Proscopio et al., 2015).

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).

Сверхэкспрессия белка p53 наблюдается в ядрах опухолевых клеток 56% сарком кошек (A. Nieto, M.A. Sanchez, E. Martinez, E. Rollan, 2003). 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).

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, наблюдается нарастающая тенденция к падению экспрессии виментина ($p_{7-к} < 0,00001$; $p_{8-к} < 0,00001$; соответственно), сопровождающаяся при этом исчезновением характерной для фибробластов морфологии (рисунок 4.1.3).

В группах 1-4 по уровню экспрессии виментина (маркер фибробластов), 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 4.1.3).

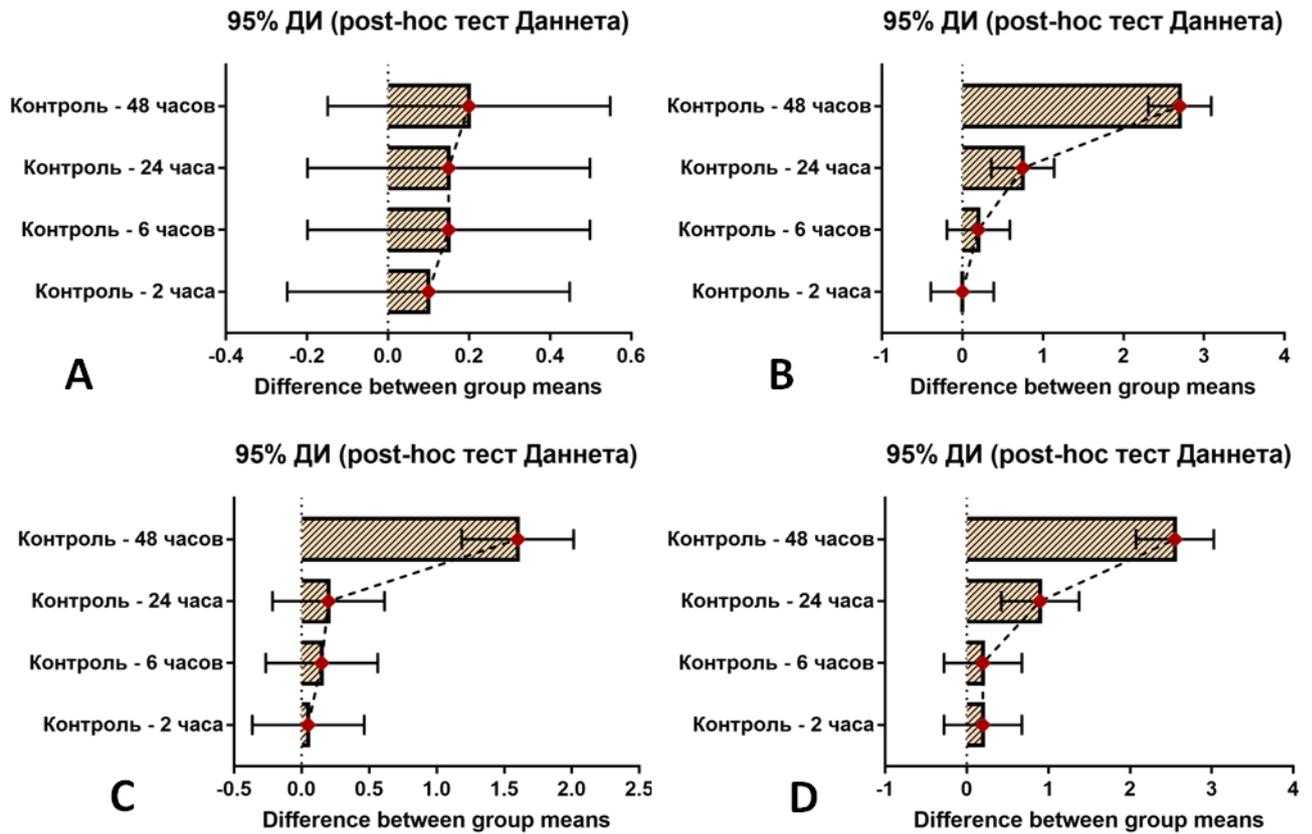


Рисунок 4.1.3 – Влияние D-аспарагина в концентрации 0,013 г/л (А, С) и 0,13 г/л (В, D) на экспрессию виментина (А, В) и Ki-67 (С, D) дермальными фибробластами человека, попарные сравнения групп 1-4 и 5-8 с контролем (one-way ANOVA, post-hoc тест Даннета). Иммуноцитохимическая реакция на Ki-67 и виментин оценивалась полуколичественно (от 0 до 4 баллов).

При кариотипировании дермальных фибробластов человека, подвергнутых инкубации в среде с 0,013 г/л D-аспарагина в группах 1-4 и 0,13 г/л D-аспарагина в группах 5-8, как и в контроле, хромосомных aberrаций не выявлено (однако в ряде случаев провести анализ не представлялось возможным из-за низкого числа метафазных пластинок).

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.

4.2. Влияние D-аспарагина на результаты липофилинга на модели дермального рубца крысы

Полученные в культуральной части исследования результаты показывающие влияние D-аспарагина на пролиферативную активность фибробластов согласуются с данными полученными *in vivo*.

Показано, что 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, $p < 0,00001$).

Применение D-аспарагина при подготовке реципиентной зоны к проведению липофилинга на рубцах, через 2 месяца после проведения липофилинга сопровождается снижением толщины эпидермиса и дермы ($p < 0,05$) в центральной зоне патологического кожного рубца крыс основной группы (рисунок 4.2.1).

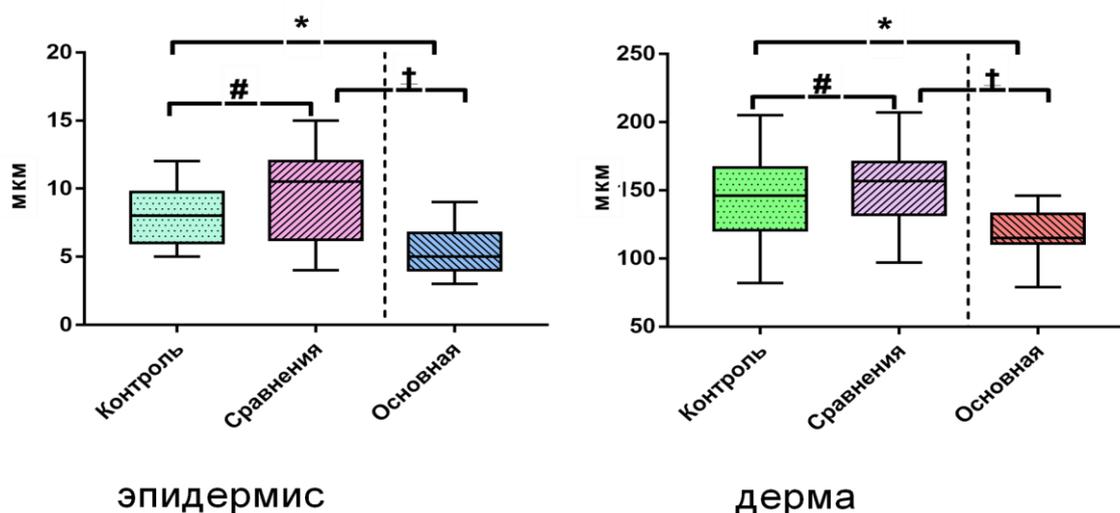


Рисунок 4.2.1 – Толщина эпидермиса и дермы через 2 месяца после проведения липофилинга; * и † – при $p < 0,05$ принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами; # – при $p > 0,05$, нулевая гипотеза об их отсутствии (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки).

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).

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).

Анализ состояния липографта на микропрепаратах окрашенных гематоксилин-эозином (рисунок 4.2.2) с использованием формализованных критериев (сохранность адипоцитов; наличие кист и вакуолей; выраженность фиброза; выраженность воспаления) по полуколичественной шкале (от 0 до 5 баллов), позволяет более точно оценить влияние проведенных вмешательств на его морфологию (S.J. Hong et al., 2010).

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 4.2.2).

Анализ микропрепаратов окрашенных по Маллори-Слинченко (рисунок 4.2.3) 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.

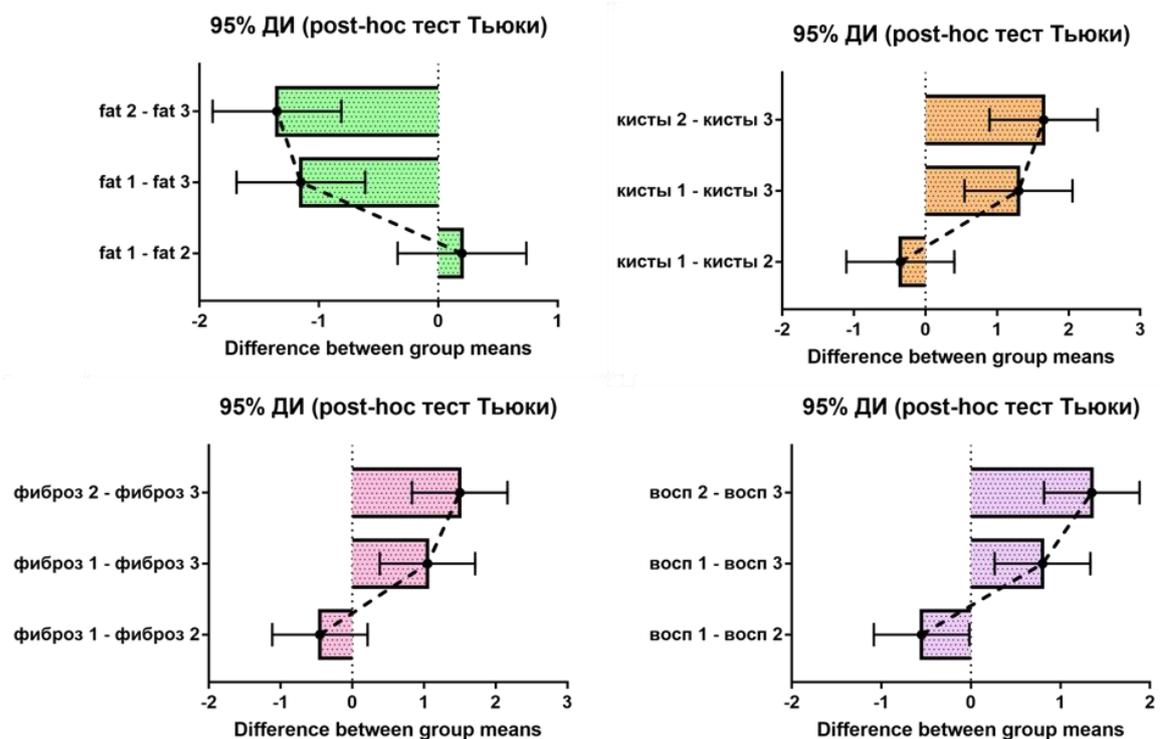


Рисунок 4.2.2 – Гистологическая оценка состояния липографта спустя 2 месяца после проведения липофилинга, полуколичественная оценка по шкале от 0 до 5 баллов, окраска гематоксилин-эозин (one-way ANOVA, post-hoc анализ Тьюки).

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 4.2.3).

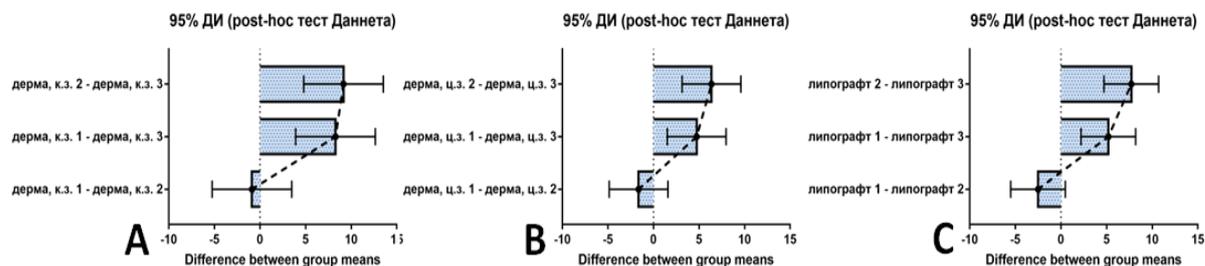


Рисунок 4.2.3 – Гистоморфометрический анализ содержания коллагеновых волокон через 2 месяца после проведения липофилинга, в % на п.з. (окраска по Маллори-Слинченко): А – дерма краевой зоны и В – дерма центральной зоны кожного рубца; С – краевая зона липографта(one-way ANOVA, post-хос анализ Даннета).

Полученные результаты помогают разрешить накопившиеся в литературе противоречия в отношении влияния D-аспарагина и D-аспартата на процессы ремоделирования эпителиальных тканей.

С целью более детальной характеристики влияния исследуемого способа подготовки реципиентной зоны на состояние дермы и липографта в области кожного рубца выполнено иммуногистохимическое исследование на такие показатели как, коллаген 1 типа (рисунок 4.2.4 А, В), виментин (рисунок 4.2.4 С, D), AIF-1 (рисунок 4.2.5), vWF (рисунок 4.2.5) и АРМАР (рисунок 4.2.6).

Выявлено, что в основной группе содержание коллагена 1 типа в краевой зоне липографта на 18,64% и 29,87% меньше, чем в группах контроля и сравнения соответственно ($p_{1-2}=0,377$; $p_{1-3}=0,269$; $p_{2-3}=0,014$).

В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание коллагена на 12,41% и 11,58% меньше, чем в группах 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 4.2.3).

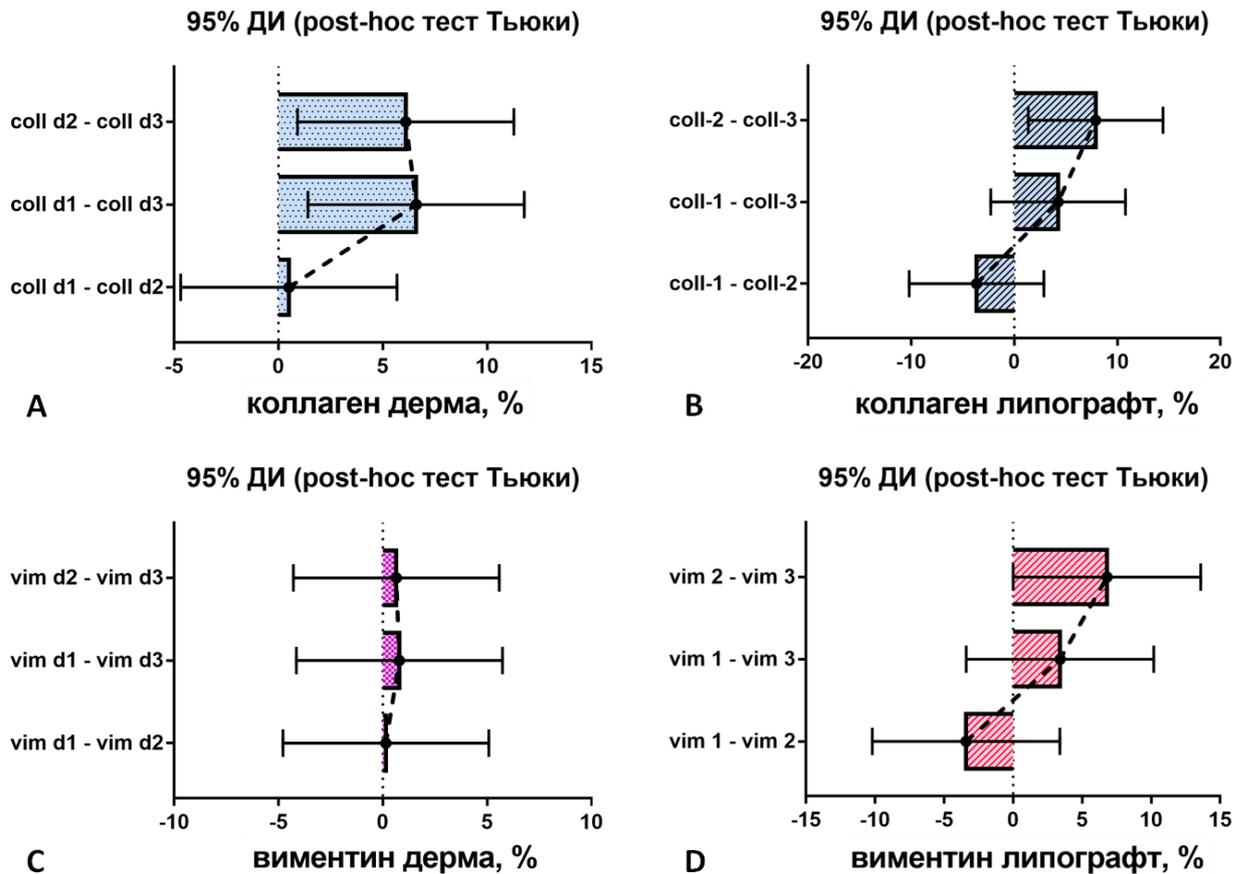


Рисунок 4.2.4 – Иммуногистохимическое исследование содержания коллагена 1 типа и виментина в зоне дермального рубца через 2 месяца после проведения липофилинга, дерма (A,C) и липографт (B,D) (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки).

По данным литературы, 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 4.2.4 D). В дерме центральной зоны рубца тенденция сохраняется, содержание виментина в основной группе 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 4.2.4 C).

Обращает на себя внимание, что в связи с особенностями ориентации соединительно-тканых волокон, в основной группе может определяться некоторое завышение уровня коллагена 1 типа и виментина, так как их

содержание определялось как процент площади окрашивания занимаемой DAB-хромогеном, по отношению к площади поля зрения.

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 (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 4.2.5).

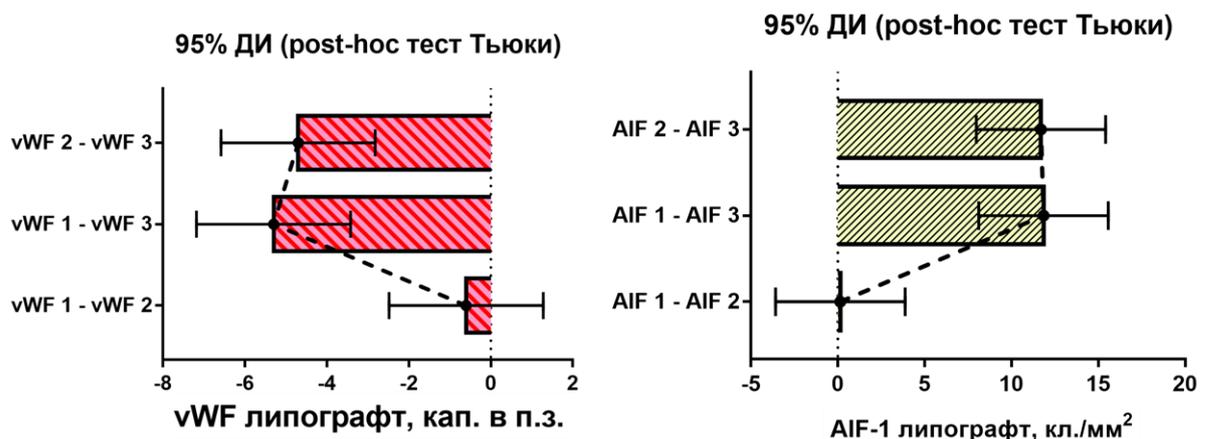


Рисунок 4.2.5 – Иммуногистохимическое исследование содержания vWF и AIF-1 в краевой зоне липографта через 2 месяца после проведения липофилинга (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки).

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 группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,055$; $p_{1-3}=0,00018$; $p_{2-3}=0,00001$) (рисунок 4.2.2).

Полученные результаты подтверждаются тем, что в основной группе содержание AIF-1 (маркер хронического воспаления) 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 4.2.5).

AIF-1 представляет собой цитоплазматический кальций-связывающий, чувствительный к воспалению каркасный белок 17 кДа, который в основном экспрессируется в клетках иммунной системы. AIF-1 усиливает экспрессию медиаторов воспаления, способствует пролиферации и миграции воспалительных клеток. Показана важная роль AIF-1 в патогенезе отторжения аллотрансплантата, аутоиммунных заболеваний, опухолей (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).

Полученные результаты в целом свидетельствуют о том, что, несмотря на использование ксенотрансплантации (от человека крысе), инъецированный жир (возможно МСК ЖТ) в целом приживается на выбранной модели (C.S. Lin, G. Lin, T.F. Lue, 2012) с легкими/умеренными признаками реакции отторжения.

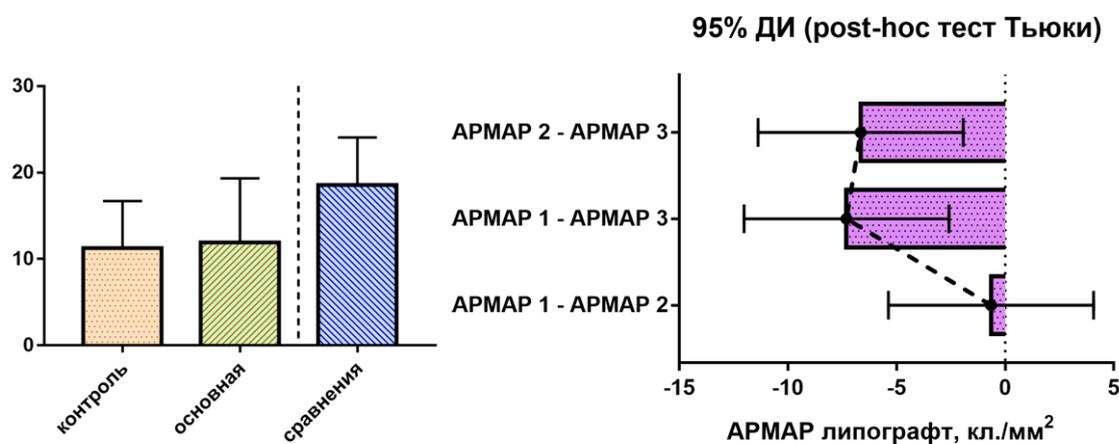


Рисунок 4.2.6 – Иммуногистохимическое исследование содержания АРМАР в краевой зоне липографта через 2 месяца после проведения липофилинга (one-way ANOVA, post-hoc анализ по Тьюки).

При оценке сохранности адипоцитов выявлено, что в основной группе показатель на 50% и 64,29% выше, чем в группах сравнения и контроля ($p_{1-2}=0,388$; $p_{1-3}=0,000038$; $p_{2-3}=0,00001$) (рисунок 4.2.2).

В пользу полученных данных свидетельствует то, что в краевой зоне липографта основной группы содержание АРМАР (маркер метаболически

активных адипоцитов и преадипоцитов) на 64,89% и 55,88% больше, чем в группах контроля и сравнения ($p_{1-2}=0,941$; $p_{1-3}=0,0013$; $p_{2-3}=0,0036$) (рисунок 4.2.6).

Экспрессия АРМАР активируется в адипоцитах мышей и человека *in vitro*, а также в генетической модели ожирения на мышах, при этом подавление экспрессии АРМАР в клетках линии *3T3-L1* критически нарушает дифференцировку МСК в адипоциты (J.G. Vogner-Strauss et al., 2010). Воздействие лиганда *adipo-8* стимулирует адипогенез посредством взаимодействия с АРМАР *in vitro* (W. Zhong et al., 2020).

Полученные данные в целом свидетельствуют, о том, что 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 всех типов соматических клеток млекопитающих. В связи с чем, представляет интерес дальнейшее изучение их роли в патофизиологии раневого процесса и рубцеобразования. 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 последствий повреждений с высоким риском развития фиброза. В заключение, полученные данные свидетельствуют о том, что D-аспарагин играет важную роль в регуляции пролиферации клеток кожи.

ВЫВОДЫ

1. По результатам морфометрии зоны дермального рубца толщина эпидермиса на 63-сутки (2 месяца) от проведения липофилинга, при использовании D-аспарагина меньше на 44,4% ($p=0,000017$) и 28,57% ($p=0,0032$), а толщина дермы меньше на 23% ($p=0,000067$) и 5,9% ($p=0,0038$), чем в группе 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% ($p_{2-3}=0,000017$); фиброзирование 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 опытной группе (с D-аспарагином) экспрессия: 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 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% ($p_{2-3}=0,0001$); АРМАР 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 липоаспирата, 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AIF-1	фактор отторжения аллогraftов-1
AMPA	α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
APMAP	белок ассоциированный с плазматической мембраной адипоцитов
bFGF	основной фактор роста фибробластов
DAAM1	растрепанно-ассоциированный активатор морфогенеза-1
Daao	оксидаза D-аминокислот
DAB	диаминобензидин тетрагидрохлорид
DDO	D-аспартат оксидаза
EGF	эпидермальный фактор роста
GnRH	гонадотропин-рилизинг-гормон
Got1L1	пиридоксаль-5-фосфат-зависимая глутамат-оксалоацетат 1-подобная трансаминаза 1
HGF	фактор роста гепатоцитов
IL-10	интерлейкин-10
IL-13	интерлейкин-13
IL-6	интерлейкин-6
mGluR5	метаботропный рецептор глутамата 5 типа
NMDA	N-метил D-аспартат
NO	оксид азота (II)
PGE₂	простагландин E ₂
PIMT	L-изоаспартил/D-аспартил-O-метил-трансфераза
PREP	пролилэндопептидаза
SRR	серинрацемаза
StAR	стероидогенный острый регуляторный белок
TGF-1β	трансформирующий фактор роста-1 β
VEGF-A	фактор роста эндотелия сосудов-A
vWF	фактор фон Виллебранда

ХТТ	2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид
α-МСГ	α -меланоцитстимулирующий гормон
АКТГ	адренкортикотропный гормон
Ауто ЖТ	аутологичная жировая ткань
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
ГГГО	гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось
ГГНС	гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
К₂-ЭДТА	дикалиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
ЛГ	лютеинизирующий гормон
МСК ЖТ	мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани
П.З.	поле зрения
ПОМК	проопиомеланокортин
ПОТ	плазма обогащенная тромбоцитами
ПФК	префронтальная кора
СВФ ЖТ	стромально-васкулярная фракция жировая ткань
СТГ	соматотропный гормон
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	хорионический гонадотропин
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	циклический гуанозинмонофосфат
ЦНС	центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зорин, В.Л. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека / В.Л. Зорин, П.Б. Копнин, А.И. Зорина [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 2. – С. 53-60.
2. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров // Санкт-Петербург: СпецЛит. – 2010. – 95 с.
3. Саруханов, Г.М. Липоскульптура как метод коррекции контуров тела. Часть I. Основные принципы и особенности аспирации, подготовки и пересадки больших объемов собственной жировой ткани / Г.М. Саруханов, И.С. Кочнева, М.Г. Левицкая [и др.] // Пластическая хирургия и косметология. – 2013. – Т. 4. – С. 555-566.
4. Сергеева, Ю.А. Липофилинг. Обзор методики, современные возможности и перспективы коррекции кожных рубцов / Ю.А. Сергеева, А.Х. Каде, С.Б. Богданов, А.И. Трофименко // Инновационная медицина Кубани. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 62-67. DOI: 10.35401/2500-0268-2019-15-3-62-67
5. Сергеева, Ю.А. Повышение эффективности липолинга 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.
6. Супотницкий, М.В. Перспективные методические подходы к доклиническому исследованию биомедицинских клеточных продуктов и возможные показатели их качества / М.В. Супотницкий, А.А. Елапов, И.В. Борисевич [и др.] // БИОпрепараты. – 2015. – Т. 53. – № 1. – С. 36-44.
7. Фадеев, Ф.А. Влияние состава ростовой среды и концентрации фетальной сыворотки на пролиферативную активность фибробластов дермы / Ф.А. Фадеев, Д.В. Луговец, М.В. Улитко [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – № 4. – С. 75-79.
8. Файн, А.М. Сравнительная оценка двух схем внутримышечного наркоза у лабораторных крыс в эксперименте / А.М. Файн, М.Н. Петухова, И.Ю. Мигулёва

- [и др.] // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2019. – Т. 22. – № 2. – С. 53-61. DOI: 10.17223/1814147/69/07
9. Чалисова, Н.И. Биологическая активность аминокислот в органотипических культурах тканей / Н.И. Чалисова, Е.А. Концевая, Н.С. Линькова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – № 2. – С. 116-120.
10. Чалисова, Н.И. Влияние кодируемых аминокислот на развитие органотипической культуры ткани кожи / Н.И. Чалисова, А.Е. Коровин // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2017. – Т. 36. – № 3. – С. 71-76.
11. Червяков, А.В. D-аминокислоты при нормальном старении и в патогенезе нейродегенеративных заболеваний / А.В. Червяков, Н.В. Гуляева, М.Н. Захарова // Нейрохимия. – 2011. – Т. 28. – № 2. – С. 113-129.
12. Червяков, А.В. Роль D-аминокислот в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и при нормальном старении / А.В. Червяков, М.Н. Захарова, Н.Б. Пестов // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2014. – Т. 8. – № 2. – С. 51-58.
13. Шаробаро, В.И. Методы оптимизации лечения и профилактики рубцов / В.И. Шаробаро, О.П. Романец, М.И. Гречишников [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2015. – № 9. – С. 85-90. DOI: 10.17116/hirurgia2015985-90
14. Abdul, M. N-methyl-D-aspartate receptor in human prostate cancer / M. Abdul, N. Hoosein // The Journal of membrane biology. – 2005. – Vol. 205. – № 3. – P. 125-128. DOI: 10.1007/s00232-005-0777-0
15. Anderson, C.M. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal / C.M. Anderson, R.J. Bridges, A.R. Chamberlin [et al.] // Journal of neurochemistry. – 2001. – Vol. 79. – № 6. – P. 1207-1216. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00668.x
16. Arkhipova, V. Binding and transport of D-aspartate by the glutamate transporter homolog GltTk / V. Arkhipova, G. Trinco, T.W. Ettema [et al.] // eLife. – 2019. – № 8. – e45286. DOI: 10.7554/eLife.45286.001

17. Atadja, P. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts / P. Atadja, H. Wong, I. Garkavtsev [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 18. – P. 8348-8352. DOI: 10.1073/pnas.92.18.8348
18. Baccari, G.C. D-Amino acids in mammalian endocrine tissues / G.C. Baccari, S. Falvo, A. Santillo [et al.] // *Amino Acids*. – 2020. – Vol. 52. – № 9. – P. 1263-1273. DOI: 10.1007/s00726-020-02892-7
19. Bak, L.K. Characterization of depolarization-coupled release of glutamate from cultured mouse cerebellar granule cells using dl-threo- β -benzyloxyaspartate (DL-TBOA) to distinguish between the vesicular and cytoplasmic pools / L.K. Bak, A. Schousboe, H.S. Waagepetersen // *Neurochemistry international*. – 2003. – Vol. 43. – № 4-5. – P. 417-424. DOI: 10.1016/S0197-0186(03)00030-5
20. Banyard, D.A. Phenotypic Analysis of Stromal Vascular Fraction after Mechanical Shear Reveals Stress-Induced Progenitor Populations / D.A. Banyard, C.N. Sarantopoulos, A.A. Borovikova [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2016. – Vol. 138. – № 2. – P. 237e-247e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000002356
21. Bastings, J.J. D-amino Acids in Health and Disease: A Focus on Cancer / J.J. Bastings, H.M. Van Eijk, S.O. Damink [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 2205. DOI: 10.3390/nu11092205
22. Bauer, D. Preferred stereoselective brain uptake of d-serine – a modulator of glutamatergic neurotransmission / D. Bauer, K. Hamacher, S. Bröer [et al.] // *Nuclear Medicine and Biology*. – 2005. – Vol. 32. – № 8. – P. 793-797. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2005.07.004
23. Bellini, E. A journey through liposuction and liposculture / E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio // *Annals of medicine and surgery*. – 2017. – Vol. 24. – P. 53-60. DOI: 10.1016/j.amsu.2017.10.024
24. Bellini, E. The science behind autologous fat grafting / E. Bellini, M.P. Grieco, E. Raposio // *Annals of medicine and surgery*. – 2017. – Vol. 24. – P. 65-73. DOI: 10.1016/j.amsu.2017.11.001

25. Berman, B. Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment / B. Berman, A. Maderal, B. Raphael // *Dermatologic Surgery*. – 2017. – Vol. 43. – P. S3-S18. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000819
26. Bertrand, B. Supportive use of platelet-rich plasma and stromal vascular fraction for cell-assisted fat transfer of skin radiation-induced lesions in nude mice / B. Bertrand, J. Eraud, M. Velier [et al.] // *Burns*. – 2020. – Vol. 46. – № 7. – P. 1641-1652. DOI: 10.1016/j.burns.2020.04.020
27. Bhat, G.K. Localization of the N-Methyl-D-Aspartate R1 Receptor Subunit in Specific Anterior Pituitary Hormone Cell Types of the Female Rat / G.K. Bhat, V.B. Mahesh, Z.W. Chu [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 1995. – Vol. 62. – P. 178-186. DOI: 10.1159/000127003
28. Bijlard, E. Intralesional 5-fluorouracil in keloid treatment: a systematic review / E. Bijlard, S. Steltenpool, F.B. Niessen // *Acta dermato-venereologica*. – 2015. – Vol. 95. – № 7. – P. 778-782. DOI: 10.2340/00015555-2106
29. Boccella, S. D-Aspartate Modulates Nociceptive-Specific Neuron Activity and Pain Threshold in Inflammatory and Neuropathic Pain Condition in Mice / S. Boccella, V. Vacca, F. Errico [et al.] // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015. – 10 pp. Article ID 905906. DOI: 10.1155/2015/905906
30. Bogner-Strauss, J.G. Reconstruction of gene association network reveals a transmembrane protein required for adipogenesis and targeted by PPAR γ / J.G. Bogner-Strauss, A. Prokesch, F. Sanchez-Cabo [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2010. – Vol. 67. – № 23. – P. 4049-4064. DOI: 10.1007/s00018-010-0424-5
31. Borovikova, A.A. Adipose-derived tissue in the treatment of dermal fibrosis: antifibrotic effects of adipose-derived stem cells / A.A. Borovikova, M.E. Ziegler, D.A. Banyard [et al.] // *Annals of Plastic Surgery*. – 2018. – Vol. 80. – № 3. – P. 297-307. DOI: 10.1097/SAP.0000000000001278
32. Bozic, M. Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells / M. Bozic, J. De Rooij, E. Parisi [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2011. – Vol. 22. – № 6. – P. 1099-1111. DOI: 10.1681/ASN.2010070701

33. Bozic, M. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS / M. Bozic, J.M. Valdivielso // *Expert opinion on therapeutic targets*. – 2015. – Vol. 19. – № 3. – P. 399-413. DOI: 10.1517/14728222.2014.983900
34. Burrone, L. Effects of D-Aspartate Treatment on D-Aspartate Oxidase, Superoxide Dismutase, and Caspase 3 Activities in Frog (*Rana esculenta*) Tissues / L. Burrone, M. Di Giovanni, M.M. Di Fiore [et al.] // *Chemistry & biodiversity*. – 2010. – Vol. 7. – № 6. – P. 1459-1466. DOI: 10.1002/cbdv.200900331
35. Burrone, L. Induced synthesis of P450 aromatase and 17beta-estradiol by D-aspartate in frog brain / L. Burrone, A. Santillo, C. Pinelli [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. – 2012. – Vol. 215. – № 20. – P. 3559-3565. DOI: 10.1242/jeb.073296
36. Calendar, R. D-tyrosyl-tRNA deacylase: a new function / R. Calendar // *Trends in biochemical sciences*. – 2017. – Vol. 42. – № 9. – P. 684-686. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.06.012
37. Charles-de-Sá, L. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells / L. Charles-de-Sá, N.F. Gontijo-de-Amorim, C.M. Takiya [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2015. – Vol. 135. – № 4. – P. 999-1009. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001123
38. Chitanava, T. The Influence of D-Asparagine on the Glial Cicatrix Formation in Experimental Spinal Stroke / T. Chitanava, I. Egiev, V. Chechelian [et al.] // *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 5. – № 3. – P. 93-96. DOI: 10.11648/j.ajcem.20170503.15
39. Coleman, S.R. Hand rejuvenation with structural fat grafting / S.R. Coleman, J.H. Carraway // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2002. – Vol. 110. – № 7. – P. 1731-1744. DOI: 10.1097/01.PRS.0000033936.43357.08
40. Coleman, S.R. Structural fat grafting: more than a permanent filler / S.R. Coleman // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2006. – Vol. 118. – № 3S. – P. 108S-120S. DOI: 10.1097/01.prs.0000234610.81672.e7
41. Condé-Green, A. Fat grafting and adipose-derived regenerative cells in burn wound healing and scarring: a systematic review of the literature / A. Condé-Green,

- A.A. Marano, E.S. Lee [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2016. – Vol. 137. – № 1. – P. 302-312. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001918
42. Crowe, A.R. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol / A.R. Crowe, W. Yue // *Bio-protocol*. – 2019. – Vol. 9. – № 24. – P. e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465
43. Cuomo, M. Selective demethylation of two CpG sites causes postnatal activation of the Dao gene and consequent removal of d-serine within the mouse cerebellum / M. Cuomo, S. Keller, D. Punzo [et al.] // *Clinical epigenetics*. – 2019. – Vol. 149. – № 11. – P. 1-16. DOI: 10.1186/s13148-019-0732-z
44. D’Aniello, A. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids / A. D’Aniello, G. D’Onofrio, M. Pischetola [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – № 36. – P. 26941-26949. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74201-X
45. D’Aniello, A. Occurrence of D-Aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release / A. D’Aniello, M.M. Di Fiore, G.H. Fisher [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2000. – Vol. 14. – № 5. – P. 699-714. DOI: 10.1096/fasebj.14.5.699
46. D’aniello, A. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role / A. D’aniello // *Brain research reviews*. – 2007. – Vol. 53. – № 2. – P. 215-234. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2006.08.005
47. De Rosa, A. Prenatal expression of d-aspartate oxidase causes early cerebral d-aspartate depletion and influences brain morphology and cognitive functions at adulthood / A. De Rosa, F. Mastrostefano, A. Di Maio [et al.] // *Amino Acids*. – 2020. – Vol. 52. – P. 597-617. DOI: 10.1007/s00726-020-02839-y
48. De Rosa, V. D-Aspartate treatment attenuates myelin damage and stimulates myelin repair / V. De Rosa, A. Secondo, A. Pannaccione [et al.] // *EMBO molecular medicine*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. e9278. DOI: 10.15252/emmm.201809278
49. Deutsch, S.I. NMDA receptors on the surface of cancer cells: target for chemotherapy? / S.I. Deutsch, A.H. Tang, J.A. Burket [et al.] // *Biomedicine &*

- Pharmacotherapy. – 2014. – Vol. 68. – № 4. – P. 493-496. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.03.012
50. Di Fiore, M.M. Current knowledge of d-aspartate in glandular tissues / M.M. Di Fiore, A. Santillo, G. Chieffi Baccari // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46. – № 8. – P. 1805-1818. DOI: 10.1007/s00726-014-1759-2
51. Di Fiore, M.M. Molecular Mechanisms Elicited by d-Aspartate in Leydig Cells and Spermatogonia / M.M. Di Fiore, A. Santillo, S. Falvo [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – № 7. – P. 1127. DOI: 10.3390/ijms17071127
52. Di Fiore, M.M. Sex hormone levels in the brain of d -aspartate-treated rats / M.M. Di Fiore, A. Santillo, S. Falvo [et al.] // *Comptes Rendus Biologies*. – 2018. – Vol. 341. – № 1. – P. 9-15. DOI: 10.1016/j.crvi.2017.11.002
53. Di Fiore, M.M. D-Aspartic Acid in Vertebrate Reproduction: Animal Models and Experimental Designs / M.M. Di Fiore, R. Boni, A. Santillo [et al.] // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9. – № 9. – P. 445. DOI: 10.3390/biom9090445
54. Di Giorgi-Gerevini, V. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells / V. Di Giorgi-Gerevini, D. Melchiorri, G. Battaglia [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2005. – Vol. 12. – № 8. – P. 1124-1133. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401639
55. Di Giovanni, M. D-Aspartate binding sites in rat Harderian gland / M. Di Giovanni, E. Topo, A. Santillo [et al.] // *Amino Acids*. – 2010. – Vol. 38. – № 1. – P. 229-235. DOI: 10.1007/s00726-008-0231-6
56. Di Nisio, A. D-Aspartic acid stimulates steroidogenesis through the delay of LH receptor internalization in a mammalian Leydig cell line / A. Di Nisio, L. De Toni, M. Ferigo [et al.] // *Journal of endocrinological investigation*. – 2016. – Vol. 39. – № 2. – P. 207-213. DOI: 10.1007/s40618-015-0333-4
57. Ding, Y. Epigenetic changes in the repression and induction of asparagine synthetase in human leukemic cell lines / Y. Ding, Z. Li, J.D. Broome // *Leukemia*. – 2005. – Vol. 19. – № 3. – P. 420-426. DOI: 10.1038/sj.leu.2403639

58. Doornaert, M. Autologous fat grafting: Latest insights / M. Doornaert, J. Colle, E. De Maere [et al.] // *Annals of Medicine and Surgery*. – 2019. – Vol. 37. – P. 47-53. DOI: 10.1016/j.amsu.2018.10.016
59. Du, S. Altered profiles and metabolism of l-and d-amino acids in cultured human breast cancer cells vs. non-tumorigenic human breast epithelial cells / S. Du, Y. Wang, N. Alatrash [et al.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2019. – Vol. 164. – P. 421-429. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.10.047
60. Dunlop, D.M. The presence of free D-aspartic acid in rodents and man / D.M. Dunlop, A. Neidle, D.M. McHale [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1986. – Vol. 141. – № 1. – P. 27-32. DOI: 10.1016/S0006-291X(86)80329-1
61. Dyakin, V.V. Racemization in Post-Translational Modifications Relevance to Protein Aging, Aggregation and Neurodegeneration: Tip of the Iceberg / V.V. Dyakin, T.M. Wisniewski, A. Lajtha // *Symmetry*. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 455. DOI: 10.3390/sym13030455
62. Englander, M.T. The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center / M.T. Englander, J.L. Avins, R.C. Fleisher [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 19. – P. 6038-6043. DOI: 10.1073/pnas.1424712112
63. Errico, F. A physiological mechanism to regulate d-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by D-aspartate oxidase deficient mice / F. Errico, M.T. Pirro, A. Affuso [et al.] // *Gene*. – 2006. – Vol. 374. – P. 50-57. DOI: 10.1016/j.gene.2006.01.010
64. Errico, F. D-Aspartate Prevents Corticostriatal Long-Term Depression and Attenuates Schizophrenia-Like Symptoms Induced by Amphetamine and MK-801 / F. Errico, S. Rossi, F. Napolitano [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28. – № 41. – P. 10404-10414. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1618-08.2008
65. Errico, F. Increased levels of d-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility / F. Errico, R. Nisticò, G. Palma [et al.] // *Molecular*

- and Cellular Neuroscience. – 2008. – Vol. 37. – № 2. – P. 236-246. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.09.012
66. Errico, F. Higher free D-aspartate and N-methyl-d-aspartate levels prevent striatal depotentiation and anticipate L-DOPA-induced dyskinesia / F. Errico, A. Bonito-Oliva, V. Bagetta [et al.] // *Experimental neurology*. – 2011. – Vol. 232. – № 2. – P. 240-250. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.09.013
67. Errico, F. Persistent increase of d-aspartate in d-aspartate oxidase mutant mice induces a precocious hippocampal age-dependent synaptic plasticity and spatial memory decay / F. Errico, R. Nisticò, F. Napolitano [et al.] // *Neurobiology of aging*. – 2011. – Vol. 32. – № 11. – P. 2061-2074. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.007
68. Errico, F. New insights on the role of free d-aspartate in the mammalian brain / F. Errico, F. Napolitano, R. Nisticò [et al.] // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 43. – № 5. – P. 1861-1871. DOI: 10.1007/s00726-012-1356-1
69. Errico, F. Free D-aspartate regulates neuronal dendritic morphology, synaptic plasticity, gray matter volume and brain activity in mammals / F. Errico, R. Nistico, A. Di Giorgio [et al.] // *Translational psychiatry*. – 2014. – Vol. 4. – № 7. – P. e417-e417. DOI: 10.1038/tp.2014.59
70. Errico, F. The Emerging Role of Altered d-Aspartate Metabolism in Schizophrenia: New Insights from Preclinical Models and Human Studies / F. Errico, T. Nuzzo, M. Carella [et al.] // *Frontiers in psychiatry*. – 2018. – Vol. 9. – P. 559. DOI: 10.3389/fpsyt.2018.00559
71. Errico, F. New insights on the influence of free d-aspartate metabolism in the mammalian brain during prenatal and postnatal life / F. Errico, M. Cuomo, N. Canu [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2020. – Vol. 1868. – № 10. – P. 140471. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140471
72. Eto, H. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes / H. Eto, H. Kato, H. Suga [et al.] // *Plastic and Reconstructive surgery*. – 2012. – Vol. 129. – № 5. – P. 1081-1092. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31824a2b19

73. Falvo, S. Androgen and oestrogen modulation by D-aspartate in rat epididymis / S. Falvo, M.M. Di Fiore, L. Burrone [et al.] // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2016. – Vol. 28. – № 12. – P. 1865-1872. DOI: 10.1071/RD15092
74. Fang, Q.Q. The effectiveness of topical anti-scarring agents and a novel combined process on cutaneous scar management / Q.Q. Fang, C.Y. Chen, M.X. Zhang [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2017. – Vol. 23. – № 15. – P. 2268-2275. DOI: 10.2174/1381612822666161025144434
75. Florio, E. Tracking the evolution of epialleles during neural differentiation and brain development: D-Aspartate oxidase as a model gene / E. Florio, S. Keller, L. Coretti [et al.] // *Epigenetics*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 41-54. DOI: 10.1080/15592294.2016.1260211
76. Fredman, R. Fat grafting for neuropathic pain after severe burns / R. Fredman, R.E. Edkins, C.S. Hultman // *Annals of plastic surgery*. – 2016. – Vol. 76. – P. S298-S303. DOI: 10.1097/SAP.0000000000000674
77. Fuchs, S.A. D-amino acids in the central nervous system in health and disease / S.A. Fuchs, R. Berger, L.W. Klomp, T.J. De Koning // *Molecular genetics and metabolism*. – 2005. – Vol. 85. – № 3. – P. 168-180. DOI: 10.1016/j.ymgme.2005.03.003
78. Fujii, N. d-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging / N. Fujii, T. Takata, N. Fujii [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2018. – Vol. 1866. – № 7. – P. 840-847. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.03.001
79. Fujino, T. Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation / T. Fujino, Y. Goto, H. Suga [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135. – № 5. – P. 1830-1837. DOI: 10.1021/ja309570x
80. Fujita, K. P53 isoforms in cellular senescence-and ageing-associated biological and physiological functions / K. Fujita // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 23. – P. 6023. DOI: 10.3390/ijms20236023
81. Furuchi, T. The role of protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) in intracellular signal transduction / T. Furuchi, K. Sakurako, M. Katane [et al.]

// Chemistry & biodiversity. – 2010. – Vol. 7. – № 6. – P. 1337-1348. DOI: 10.1002/cbdv.200900273

82. Furusho, A. Three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of Asn, Ser, Ala, and Pro enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease / A. Furusho, R. Koga, T. Akita [et al.] // Analytical chemistry. – 2019. – Vol. 91. – № 18. – P. 1337-1348. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01615

83. Gal, S. Autologous fat grafting does not improve burn scar appearance: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, pilot study / S. Gal, J.I. Ramirez, P. Maguina // Burns. – 2017. – Vol. 43. – № 3. – P. 486-489. DOI: 10.1016/j.burns.2016.09.019

84. Genchi, G. An overview on d-amino acids / G. Genchi // Amino Acids. – 2017. – Vol. 49. – № 9. – P. 1521-1533. DOI: 10.1007/s00726-017-2459-5

85. Gentile, P. Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma / P. Gentile, C. Di Pasquali, I. Bocchini [et al.] // Surgical innovation. – 2013. – Vol. 20. – № 4. – P. 370-376. DOI: 10.1177/1553350612458544

86. Gentile, P. Systematic review: Advances of fat tissue engineering as bioactive scaffold, bioactive material, and source for adipose-derived mesenchymal stem cells in wound and scar treatment / P. Gentile, A. Sterodimas, C. Calabrese [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-16. DOI: 10.1186/s13287-021-02397-4

87. Gong, X.Q. D-Aspartate and NMDA, but not L-aspartate, block AMPA receptors in rat hippocampal neurons / X.Q. Gong, A. Frandsen, W.Y. Lu [et al.] // British journal of pharmacology. – 2005. – Vol. 145. – № 4. – P. 449-459. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706199

88. Gontijo-de-Amorim, N.F. Mechanical supplementation with the stromal vascular fraction yields improved volume retention in facial lipotransfer: a 1-year comparative study / N.F. Gontijo-de-Amorim, L. Charles-de-Sá, G. Rigotti // Aesthetic surgery journal. – 2017. – Vol. 37. – № 9. – P. 975-985. DOI: 10.1093/asj/sjx115

89. Guida, F. Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice

/ F. Guida, L. Luongo, F. Marmo [et al.] // *Molecular brain*. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-15. DOI: 10.1186/s13041-015-0139-5

90. Hamase, K. Regional distribution and postnatal changes of d-amino acids in rat brain / K. Hamase, H. Homma, Y. Takigawa [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1997. – Vol. 1334. – № 2-3. – P. 214-222. DOI: 10.1016/S0304-4165(96)00095-5

91. Hamase, K. Sensitive Determination of D-Amino Acids in Mammals and the Effect of D-Amino-Acid Oxidase Activity on Their Amounts / K. Hamase, R. Konno, A. Morikawa [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2005. – Vol. 28. – № 9. – P. 1578-1584. DOI: 10.1248/bpb.28.1578

92. Han, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells treatments for fibroblasts of fibrotic scar via downregulating TGF- β 1 and Notch-1 expression enhanced by photobiomodulation therapy / B. Han, J. Fan, L. Liu [et al.] // *Lasers in medical science*. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – P. 1-10. DOI: 10.1007/s10103-018-2567-9

93. Han, H. Enantioselective micro-2D-HPLC determination of aspartic acid in the pineal glands of rodents with various melatonin contents / H. Han, Y. Miyoshi, T. Oyama [et al.] // *Journal of separation science*. – 2011. – Vol. 34. – № 20. – P. 2847-2853. DOI: 10.1002/jssc.201100609

94. Han, H. Simultaneous determination of d-aspartic acid and d-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure / H. Han, Y. Miyoshi, K. Ueno [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2011. – Vol. 879. – № 29. – P. 3196-3202. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.01.023

95. Han, H. Changes in d-aspartic acid and d-glutamic acid levels in the tissues and physiological fluids of mice with various d-aspartate oxidase activities / H. Han, Y. Miyoshi, R. Koga [et al.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2015. – Vol. 116. – P. 47-52. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.05.013

96. Han, M. Development and validation of a rapid, selective, and sensitive LC–MS/MS method for simultaneous determination of d- and l-amino acids in human serum: application to the study of hepatocellular carcinoma / M. Han, M. Xie, J. Han [et al.] //

Analytical and bioanalytical chemistry. – 2018. – Vol. 410. – № 10. – P. 2517-2531.
DOI: 10.1007/s00216-018-0883-3

97. Harada, M. Simultaneous Analysis of d, l-Amino Acids in Human Urine Using a Chirality-Switchable Biaryl Axial Tag and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry / M. Harada, S. Karakawa, H. Miyano, K. Shimbo // *Symmetry*. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 913. DOI: 10.3390/sym12060913

98. Hardingham, G.E. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling / G.E. Hardingham, H. Bading // *Trends in neurosciences*. – 2003. – Vol. 26. – № 2. – P. 81-89. DOI: 10.1016/S0166-2236(02)00040-1

99. Harrell, C.R. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome / C.R. Harrell, C. Fellabaum, N. Jovicic [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 5. – P. 467. DOI: 10.3390/cells8050467

100. Harris, W.M. Endothelial differentiated adipose-derived stem cells improvement of survival and neovascularization in fat transplantation / W.M. Harris, M. Plastini, N. Kappy [et al.] // *Aesthetic surgery journal*. – 2018. – Vol. 39. – № 2. – P. 220-232. DOI: 10.1093/asj/sjy130

101. Hashimoto, A. Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthaldialdehyde / A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka [et al.] // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 1992. – Vol. 582. – № 1-2. – P. 41-48. DOI: 10.1016/0378-4347(92)80300-F

102. Hashimoto, A. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex / A. Hashimoto, S. Kumashiro, T. Nishikawa [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 1993. – Vol. 61. – № 1. – P. 348-351. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03575.x

103. Hashimoto, A. Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery / A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka [et al.] // *FEBS letters*. – 1993. – Vol. 331. – № 1-2. – P. 4-8. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80286-4

104. Hashimoto, A. Anatomical Distribution and Postnatal Changes in Endogenous Free D-Aspartate and D-Serine in Rat Brain and Periphery / A. Hashimoto, T. Oka, T.

- Nishikawa // *European Journal of Neuroscience*. – 1995. – Vol. 7. – № 8. – P. 1657-1663. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb00687.x
105. Hashimoto, A. Free d-aspartate and d-serine in the mammalian brain and periphery / A. Hashimoto, T. Oka // *Progress in neurobiology*. – 1997. – Vol. 52. – № 4. – P. 325-353. DOI: 10.1016/S0301-0082(97)00019-1
106. He, X. New progress of adipose-derived stem cells in the therapy of hypertrophic scars / X. He, J. Zhang, L. Luo [et al.] // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. 77-85. DOI: 10.2174/1574888X14666190904125800
107. He, Y. Stromal vascular fraction cells plus sustained release VEGF/Ang-1-PLGA microspheres improve fat graft survival in mice / Y. He, X. Yu, Z. Chen [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2019. – Vol. 234. – № 5. – P. 6136-6146. DOI: 10.1002/jcp.27368
108. Hettmer, S. Functional genomic screening reveals asparagine dependence as a metabolic vulnerability in sarcoma / S. Hettmer, A.C. Schinzel, D. Tchessalova [et al.] // *Elife*. – 2015. – Vol. 4. – P. e09436. DOI: 10.7554/eLife.09436.001
109. Hogan-Cann, A.D. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors / A.D. Hogan-Cann, C.M. Anderson // *Trends in pharmacological sciences*. – 2016. – Vol. 37. – № 9. – P. 750-767. DOI: 10.1016/j.tips.2016.05.012
110. Hong, S.J. Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and β -fibroblast growth factor in autologous fat transplantation / S.J. Hong, J.H. Lee, S.M. Hong, C.H. Park // *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. – 2010. – Vol. 63. – № 7. – P. 1202-1208. DOI: 10.1016/j.bjps.2009.05.040
111. Hong, J.H. A simple morphometric analysis method for dermal microstructure using color thresholding and moments / J.H. Hong, D.H. Kim, I.J. Rhyu [et al.] // *Skin Research and Technology*. – 2020. – Vol. 26. – № 1. – P. 132-136. DOI: 10.1111/srt.12776
112. Horio, M. Decreased levels of free d-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice / M. Horio, T. Ishima, Y. Fujita [et al.] // *Neurochemistry international*. – 2013. – Vol. 62. – № 6. – P. 843-847. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.02.015

113. Hou, A. Microneedling: a comprehensive review / A. Hou, B. Cohen, A. Haimovic [et al.] // *Dermatologic Surgery*. – 2017. – Vol. 43. – № 3. – P. 321-339. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000924
114. Huang, A.S. D-Aspartate Regulates Melanocortin Formation and Function: Behavioral Alterations in D-Aspartate Oxidase-Deficient Mice / A.S. Huang, A. Beigneux, Z.M. Weil [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 10. – P. 2814-2819. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5060-05.2006
115. Ikonomidou, C. Triggers of apoptosis in the immature brain / C. Ikonomidou // *Brain and Development*. – 2009. – Vol. 31. – № 7. – P. 488-492. DOI: 10.1016/j.braindev.2009.02.006
116. Imai, K. Occurrence of D-aspartic acid in rat brain pineal gland / K. Imai, T. Fukushima, K. Hagiwara, T. Santa // *Biomedical Chromatography*. – 1995. – Vol. 9. – № 2. – P. 106-109. DOI: 10.1002/bmc.1130090211
117. Ishio, S. D-Aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes / S. Ishio, H. Yamada, M. Hayashi [et al.] // *Neuroscience letters*. – 1998. – Vol. 249. – № 2-3. – P. 143-146. DOI: 10.1016/S0304-3940(98)00414-5
118. Ito, T. Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis / T. Ito, M. Hayashida, S. Kobayashi [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 2016. – Vol. 160. – № 6. – P. 345-353. DOI: 10.1093/jb/mvw043
119. Jagannath, V. Expression of D-Amino Acid Oxidase (DAO/DAAO) and D-Amino Acid Oxidase Activator (DAOA/G72) during Development and Aging in the Human Post-mortem Brain / V. Jagannath, Z. Marinova, C.M. Monoranu [et al.] // *Frontiers in neuroanatomy*. – 2017. – Vol. 11. – P. 31. DOI: 10.3389/fnana.2017.00031
120. James, I.B. Fat, stem cells, and platelet-rich plasma / I.B. James, S.R. Coleman, J.P. Rubin // *Clinics in plastic surgery*. – 2016. – Vol. 43. – № 3. – P. 473-488. DOI: 10.1016/j.cps.2016.03.017
121. Jami, S.A. Increased excitation-inhibition balance due to a loss of GABAergic synapses in the serine racemase knockout model of NMDA receptor hypofunction / S.A. Jami, S. Cameron, J.M. Wong [et al.] // *bioRxiv*. – 2020. DOI: 10.1101/2020.09.18.304170

122. Jansson, L.C. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells / L.C. Jansson, K.E. Akerman // *Journal of neural transmission*. – 2014. – Vol. 121. – № 8. – P. 819-836. DOI: 10.1007/s00702-014-1174-6
123. Jaspers, M.E. Sustainable effectiveness of single-treatment autologous fat grafting in adherent scars / M.E. Jaspers, K.M. Brouwer, A.J. van Trier [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. – 2017. – Vol. 25. – № 2. – P. 316-319. DOI: 10.1111/wrr.12521
124. Jiang, J. Asparagine, a critical limiting metabolite during glutamine starvation / J. Jiang, N.N. Pavlova, J. Zhang // *Molecular & cellular oncology*. – 2018. – Vol. 5. – № 3. – P. e1441633. DOI: 10.1080/23723556.2018.1441633
125. Jones, C.D. The use of chemotherapeutics for the treatment of keloid scars / C.D. Jones, L. Guiot, M. Samy [et al.] // *Dermatology reports*. – 2015. – Vol. 7. – № 2. – P. 5880. DOI: 10.4081/dr.2015.5880
126. Karakawa, S. Simultaneous analysis of d-alanine, d-aspartic acid, and d-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues / S. Karakawa, K. Shimbo, N. Yamada [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2015. – Vol. 115. – P. 123-129. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.05.024
127. Katane, M. D-Aspartate Oxidase: The Sole Catabolic Enzyme Acting on Free D-Aspartate in Mammals / M. Katane, H. Homma // *Chemistry & biodiversity*. – 2010. – Vol. 7. – № 6. – P. 1435-1449. DOI: 10.1002/cbdv.200900250
128. Katane, M. Characterization of the Enzymatic and Structural Properties of Human D-Aspartate Oxidase and Comparison with Those of the Rat and Mouse Enzymes / M. Katane, T. Kawata, K. Nakayama [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2015. – Vol. 38. – № 2. – P. 298-305. DOI: 10.1248/bpb.b14-00690
129. Katane, M. Biochemical characterization of d-aspartate oxidase from *Caenorhabditis elegans*: Its potential use in the determination of free d-glutamate in biological samples / M. Katane, H. Kuwabara, K. Nakayama [et al.] // *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – Vol. 1868. – № 8. – P. 140442. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140442
130. Keller, S. DNA methylation landscape of the genes regulating D-serine and D-aspartate metabolism in post-mortem brain from controls and subjects with schizophrenia / S. Keller, D. Punzo, M. Cuomo [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-14. DOI: 10.1038/s41598-018-28332-x
131. Kelmendi-Doko, A. Adipogenic factor-loaded microspheres increase retention of transplanted adipose tissue / A. Kelmendi-Doko, K.G. Marra, N. Vidic [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2014. – Vol. 20. – № 17-18. – P. 2283-2290. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0701
132. Khansa, I. Evidence-based scar management: how to improve results with technique and technology / I. Khansa, B. Harrison, J.E. Janis // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2016. – Vol. 138. – № 3S. – P. 165S-178S. DOI: 10.1097/PRS.0000000000002647
133. Khorasani, H. A quantitative approach to scar analysis / H. Khorasani, Z. Zheng, C. Nguyen [et al.] // *The American journal of pathology*. – 2011. – Vol. 178. – № 2. – P. 621-628. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.10.019
134. Khouri, R.K. Current clinical applications of fat grafting / R.K. Khouri // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2017. – Vol. 140. – № 3. – P. 466e-486e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000003648
135. Khouri, R.K. Percutaneous aponeurotomy and lipofilling: a regenerative alternative to flap reconstruction? / R.K. Khouri, J.M. Smit, E. Cardoso [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2013. – Vol. 132. – № 5. – P. 1280-1290. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182a4c3a9
136. Kim, E. Phenotypic analysis of seizure-prone mice lacking L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase / E. Kim, J.D. Lowenson, S. Clarke [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 29. – P. 20671-20678. DOI: 10.1074/jbc.274.29.20671
137. Kim, I.S. The effect of differential modulation of n-methyl-d-aspartate receptor on the viability of primary cultured normal human oral keratinocytes / I.S. Kim, W. Lee,

- S.H. Kim, B. Choi // *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2006. – Vol. 28. – № 4. – P. 277-286.
138. Kim, I.S. The effect of differential modulation of N-methyl-D-aspartate receptor on the proliferation of primary cultured normal human oral keratinocytes: DNA synthesis rate analysis / I.S. Kim, K.S. Paik, M.S. Chang [et al.] // *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. – 2007. – Vol. 33. – № 2. – P. 124-130.
139. Kim, P.M. Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis / P.M. Kim, X. Duan, A.S. Huang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 7. – P. 3175-3179. DOI: 10.1073/pnas.0914706107
140. Kimura, T. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease / T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-7. DOI: 10.1038/srep26137
141. Kimura, T. D-Amino acids and kidney diseases / T. Kimura, A. Hesaka, Y. Isaka // *Clinical and experimental nephrology*. – 2020. – Vol. 24. – № 5. – P. 404-410. DOI: 10.1007/s10157-020-01862-3
142. Kitamura, A. Ingested d-aspartate facilitates the functional connectivity and modifies dendritic spine morphology in rat hippocampus / A. Kitamura, Y. Hojo, M. Ikeda [et al.] // *Cerebral Cortex*. – 2019. – Vol. 29. – № 6. – P. 2499-2508. DOI: 10.1093/cercor/bhy120
143. Klinger, M. Autologous fat graft in scar treatment / M. Klinger, F. Caviggioli, F.M. Klinger [et al.] // *Journal of Craniofacial Surgery*. – 2013. – Vol. 24. – № 5. – P. 1610-1615. DOI: 10.1097/SCS.0b013e3182a24548
144. Kmiec, Z. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice* / Z. Kmiec, J.A. Kiernan // Scion Publishing. – 2015. – 571 pp.
145. Komuro, H. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors / H. Komuro, P. Rakic // *Science*. – 1993. – Vol. 260. – № 5104. – P. 95-97. DOI: 10.1126/science.8096653

146. Korzyńska, A. A method of estimation of the cell doubling time on basis of the cell culture monitoring data / A. Korzyńska, M. Zychowicz // *Biocybernetics and Biomedical Engineering*. – 2008. – Vol. 28. – № 4. – P. 75-82.
147. Krall, A.S. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor / A.S. Krall, S. Xu, T.G. Graeber [et al.] // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-13. DOI: 10.1038/ncomms11457
148. Krall, A.S. Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth / A.S. Krall, P.J. Mullen, F. Surjono [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2021. – Vol. 33. – № 5. – P. 1013-1026. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.02.001
149. Krashia, P. Persistent elevation of D-Aspartate enhances NMDA receptor-mediated responses in mouse substantia nigra pars compacta dopamine neurons / P. Krashia, A. LeDonne, A. Nobili [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol. 103. – P. 69-78. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.013
150. Krastev, T.K. Autologous fat transfer to treat fibrosis and scar-related conditions: A systematic review and meta-analysis / T.K. Krastev, S.J. Schop, J. Hommes [et al.] // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2020. – Vol. 73. – № 11. – P. 2033-2048. DOI: 10.1016/j.bjps.2020.08.023
151. Kulju, K.S. Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts / K.S. Kulju, J.M. Lehman // *Experimental cell research*. – 1995. – Vol. 217. – № 2. – P. 336-345. DOI: 10.1006/excr.1995.1095
152. Laloze, J. Cell-assisted lipotransfer: Friend or foe in fat grafting? Systematic review and meta-analysis / J. Laloze, A. Varin, J. Gilhodes [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2018. – Vol. 12. – № 2. – P. e1237-e1250. DOI: 10.1002/term.2524
153. Langen, K.J. Preferred stereoselective transport of the D-isomer of cis-4-[18F] fluoro-proline at the blood–brain barrier / K.J. Langen, K. Hamacher, D. Bauer [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2005. – Vol. 25. – № 5. – P. 607-616. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600065

154. Lee, J.A. D-Aspartate localization in the rat pituitary gland and retina / J.A. Lee, H. Homma, K. Tashiro [et al.] // *Brain research*. – 1999. – Vol. 838. – № 1-2. – P. 193-199. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01718-7
155. Lee, J.A. Localization, Transport, and Uptake of -Aspartate in the Rat Adrenal and Pituitary Glands / J.A. Lee, Z. Long, N. Nimura [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2001. – Vol. 385. – № 2. – P. 242-249. DOI: 10.1006/abbi.2000.2163
156. Lee, S. What is the proper way to apply the multiple comparison test? / S. Lee, D.K. Lee // *Korean journal of anesthesiology*. – 2018. – Vol. 71. – № 5. – P. 353-360. DOI: 10.4097/kja.d.18.00242
157. Li, M. The Efficacy of Cell-Assisted Lipotransfer Versus Conventional Lipotransfer in Breast Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. Li, C. Chen // *Aesthetic Plastic Surgery*. – 2021. – P. 1-9. DOI: 10.1007/s00266-020-02123-0
158. Li, P. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration / P. Li, X. Guo // *Stem cell research & therapy*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-7. DOI: 10.1186/s13287-018-1044-5
159. Li, X. NMDA receptor activation inhibits the antifibrotic effect of BM-MSCs on bleomycin-induced pulmonary fibrosis / X. Li, C. Li, Y. Tang [et al.] // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2018. – Vol. 315. – № 3. – P. L404-L421. DOI: 10.1152/ajplung.00002.2018
160. Li, Y. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway / Y. Li, W. Zhang, J. Gao [et al.] // *Stem cell research & therapy*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-16. DOI: 10.1186/s13287-016-0356-6
161. Li, Y. Role of D-aspartate on biosynthesis, racemization, and potential functions: A mini-review / Y. Li, H. Han, J. Yin [et al.] // *Animal Nutrition*. – 2018. – Vol. 4. – № 3. – P. 311-315. DOI: 10.1016/j.aninu.2018.04.003
162. Liao, H.T. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review / H.T. Liao, K.G. Marra, J.P. Rubin // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 267-276. DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0317

163. Lin, C.S. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants / C.S. Lin, G. Lin, T.F. Lue // *Stem cells and development*. – 2012. – Vol. 21. – № 15. – P. 2770-2778. DOI: 10.1089/scd.2012.0176
164. Lin, T. Emerging roles of p53 related lncRNAs in cancer progression: a systematic review / T. Lin, P.F. Hou, S. Meng [et al.] // *International journal of biological sciences*. – 2019. – Vol. 15. – № 6. – P. 1287. DOI: 10.7150/ijbs.33218
165. Lloyd, M.D. Racemases and epimerases operating through a 1, 1-proton transfer mechanism: reactivity, mechanism and inhibition / M.D. Lloyd, M. Yevglevskis, A. Nathubhai [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – P. 5952-5984. DOI: 10.1039/D0CS00540A
166. Lomelino, C.L. Asparagine synthetase: function, structure, and role in disease / C.L. Lomelino, J.T. Andring, R. McKenna [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292. – № 49. – P. 19952-19958. DOI: 10.1074/jbc.R117.819060
167. Long, Z. Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells / Z. Long, H. Homma, J.A. Lee [et al.] // *FEBS letters*. – 1998. – Vol. 434. – № 3. – P. 231-235. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00986-7
168. Long, Z. D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH3) / Z. Long, J.A. Lee, T. Okamoto [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2000. – Vol. 276. – № 3. – P. 1143-1147. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3573
169. Long, Z. Cell density inversely regulates D-and L-aspartate levels in rat pheochromocytoma MPT1 cells / Z. Long, M. Sekine, M. Adachi [et al.] // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2002. – Vol. 404. – № 1. – P. 92-97. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00241-2
170. Luo, T. NMDA receptor signaling: Death or survival? / T. Luo, W.H. Wu, B.S. Chen // *Frontiers in biology*. – 2011. – Vol. 6. – № 6. – P. 468-476. DOI: 10.1007/s11515-011-1187-6
171. Ma, J. Hepatocyte growth factor secreted from human adipose-derived stem cells inhibits fibrosis in hypertrophic scar fibroblasts / J. Ma, X. Yan, Y. Lin [et al.] //

Current molecular medicine. – 2020. – Vol. 20. – № 7. – P. 558-571. DOI: 10.2174/1566524020666200106095745

172. Mashiko, T. How does fat survive and remodel after grafting? / T. Mashiko, K. Yoshimura // Clinics in Plastic Surgery. – 2015. – Vol. 42. – № 2. – P. 181-190. DOI: 10.1016/j.cps.2014.12.008

173. Matsuda, S. Biosynthesis of d-aspartate in mammals: the rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of d-aspartate / S. Matsuda, M. Katane, K. Maeda [et al.] // Amino Acids. – 2015. – Vol. 47. – № 5. – P. 975-985. DOI: 10.1007/s00726-015-1926-0

174. Melief, S.M. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory function: the link with key immunoregulatory molecules / S.M. Melief, S.B. Geutskens, W.E. Fibbe [et al.] // Haematologica. – 2013. – Vol. 98. – № 9. – P. e121-e122. DOI: 10.3324/haematol.2013.093864

175. Mineda, K. Chronic inflammation and progressive calcification as a result of fat necrosis: the worst outcome in fat grafting / K. Mineda, S. Kuno, H. Kato [et al.] // Plastic and reconstructive surgery. – 2014. – Vol. 133. – № 5. – P. 1064-1072. DOI: 10.1097/PRS.0000000000000097

176. Miyoshi, Y. HPLC analysis of naturally occurring free d-amino acids in mammals / Y. Miyoshi, R. Koga, T. Oyama [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – Vol. 69. – P. 42-49. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.01.041

177. Mohan, A. Use of fat transfer to treat a chronic, non-healing, post-radiation ulcer: a case study / A. Mohan, S. Singh // Journal of wound care. – 2017. – Vol. 26. – № 5. – P. 272-273. DOI: 10.12968/jowc.2017.26.5.272

178. Molinaro, G. D-Aspartate activates mGlu receptors coupled to polyphosphoinositide hydrolysis in neonate rat brain slices / G. Molinaro, S. Pietracupa, L. Di Menna [et al.] // Neuroscience letters. – 2010. – Vol. 478. – № 3. – P. 128-130. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.04.077

179. Molla, G. Structure and kinetic properties of human d-aspartate oxidase, the enzyme-controlling d-aspartate levels in brain / G. Molla, A. Chaves-Sanjuan, A.

- Savinelli [et al.] // The FASEB Journal. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – P. 1182-1197. DOI: 10.1096/fj.201901703R
180. Mori, Y. UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of N ϵ -carboxymethyl lysine (CML) in keratin of skin / Y. Mori, K. Aki, K. Kuge [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2011. – Vol. 879. – № 29. – P. 3303-3309. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.010
181. Morikawa, A. Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity / A. Morikawa, K. Hamase, T. Inoue [et al.] // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 2001. – Vol. 757. – № 1. – P. 119-125. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00131-1
182. Nagata, Y. D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells / Y. Nagata, H. Homma, J.A. Lee [et al.] // FEBS letters. – 1999. – Vol. 444. – № 2-3. – P. 160-164. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00045-9
183. Nagata, Y. Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by D-aspartate in rat Leydig cells / Y. Nagata, H. Homma, M. Matsumoto, K. Imai // FEBS letters. – 1999. – Vol. 454. – № 3. – P. 317-320. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00840-6
184. Nahm, W.K. Significance of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor-mediated signaling in human keratinocytes / W.K. Nahm, B.D. Philpot, M.M. Adams [et al.] // Journal of cellular physiology. – 2004. – Vol. 200. – № 2. – P. 309-317. DOI: 10.1002/jcp.20010
185. Nakamura, S. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats / S. Nakamura, M. Ishihara, M. Takikawa [et al.] // Annals of plastic surgery. – 2010. – Vol. 65. – № 1. – P. 101-106. DOI: 10.1097/SAP.0b013e3181b0273c
186. Nakatsuka, S. D-Aspartate is stored in secretory granules and released through a Ca²⁺-dependent pathway in a subset of rat pheochromocytoma PC12 cells / S. Nakatsuka, M. Hayashi, A. Muroyama [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276. – № 28. – P. 26589-26596. DOI: 10.1074/jbc.M011754200

187. Negenborn, V.L. The use of autologous fat grafting for treatment of scar tissue and scar-related conditions: a systematic review / V.L. Negenborn, J.W. Groen, J.M. Smit [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2016. – Vol. 137. – № 1. – P. 31e-43e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001850
188. Ngan, C.Y. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer / C.Y. Ngan, H. Yamamoto, I. Seshimo [et al.] // *British journal of cancer*. – 2007. – Vol. 96. – № 6. – P. 986-992. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603651
189. Nieto, A. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor- α in feline vaccine-associated sarcomas / A. Nieto, M.A. Sanchez, E. Martinez, E. Rollan // *Veterinary Pathology*. – 2003. – Vol. 40. – № 6. – P. 651-658. DOI: 10.1354/vp.40-6-651
190. North, W.G. Breast cancer expresses functional NMDA receptors / W.G. North, G. Gao, V.A. Memoli [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2010. – Vol. 122. – № 2. – P. 307-314. DOI: 10.1007/s10549-009-0556-1
191. Nuzzo, T. Decreased free d-aspartate levels are linked to enhanced d-aspartate oxidase activity in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients / T. Nuzzo, S. Sacchi, F. Errico [et al.] // *npj Schizophrenia*. – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-10. DOI: 10.1038/s41537-017-0015-7
192. Nuzzo, T. Free D-aspartate triggers NMDA receptor-dependent cell death in primary cortical neurons and perturbs JNK activation, Tau phosphorylation, and protein SUMOylation in the cerebral cortex of mice lacking d-aspartate oxidase activity / T. Nuzzo, M. Feligioni, L. Cristino [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2019. – Vol. 317. – P. 51-65. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.02.014
193. Oranges, C.M. The impact of recipient site external expansion in fat grafting surgical outcomes / C.M. Oranges, J. Striebel, M. Treppe [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. – 2018. – Vol. 6. – № 2. DOI: 10.1097/GOX.0000000000001649
194. Oranges, C.M. The preparation of the recipient site in fat grafting: A comprehensive review of the preclinical evidence / C.M. Oranges, J. Striebel, M. Treppe

- [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2019. – Vol. 143. – № 4. – P. 1099-1107. DOI: 10.1097/PRS.0000000000005403
195. Osinga, R. Effects of intersyringe processing on adipose tissue and its cellular components: implications in autologous fat grafting / R. Osinga, N.R. Menzi, L.A. Tchang [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2015. – Vol. 135. – № 6. – P. 1618-1628. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001288
196. Ota, N. D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems / N. Ota, T. Shi, J.V. Sweedler // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 43. – № 5. – P. 1873-1886. DOI: 10.1007/s00726-012-1364-1
197. Palacín, M. Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters / M. Palacín, R. Estévez, J. Bertran, A. Zorzano // *Physiological reviews*. – 1998. – Vol. 78. – № 4. – P. 969-1054. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.4.969
198. Pampillo, M. The effect of D-aspartate on luteinizing hormone-releasing hormone, α -melanocyte-stimulating hormone, GABA and dopamine release / M. Pampillo, T. Scimonelli, M.C. Bottino [et al.] // *NeuroReport*. – 2002. – Vol. 13. – № 17. – P. 2341-2344.
199. Pathria, G. Translational reprogramming marks adaptation to asparagine restriction in cancer / G. Pathria, J.S. Lee, E. Hasnis [et al.] // *Nature cell biology*. – 2019. – Vol. 21. – № 12. – P. 1590-1603. DOI: 10.1038/s41556-019-0415-1
200. Peer, L.A. Cell survival theory versus replacement theory / L.A. Peer // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 1955. – Vol. 16. – № 3. – P. 161-168.
201. Procopio, M.G. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation / M.G. Procopio, C. Laszlo, D. Al Labban [et al.] // *Nature cell biology*. – 2015. – Vol. 17. – № 9. – P. 1193-1204. DOI: 10.1038/ncb3228
202. Puggioni, V. Biochemical characterization of mouse d-aspartate oxidase / V. Puggioni, A. Savinelli, M. Miceli [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2020. – Vol. 1868. – № 10. – P. 140472. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140472
203. Punzo, D. Age-related changes in D-aspartate oxidase promoter methylation control extracellular D-aspartate levels and prevent precocious cell death during brain

- aging / D. Punzo, F. Errico, L. Cristino [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36. – № 10. – P. 3064-3078. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3881-15.2016
204. Rabattoni, V. Cellular studies of the two main isoforms of human d-aspartate oxidase / V. Rabattoni, L. Pollegioni, G. Tedeschi [et al.] // *The FEBS Journal*. – 2021. DOI: 10.1111/febs.15797
205. Ramot, Y. Translational Neuroendocrinology of Human Skin: Concepts and Perspectives / Y. Ramot, M. Böhm, R. Paus // *Trends in Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 1. – P. 60-74. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.09.002
206. Ransom, R.W. Cooperative modulation of [3H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines / R.W. Ransom, N.L. Stec // *Journal of neurochemistry*. – 1988. – Vol. 51. – № 3. – P. 830-836. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb01818.x
207. Rasmussen, B.S. Cell-enriched fat grafting improves graft retention in a porcine model: A dose-response study of adipose-derived stem cells versus stromal vascular fraction / B.S. Rasmussen, C.L. Sørensen, S. Kurbegovic [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2019. – Vol. 144. – № 3. – P. 397e-408e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000005920
208. Raspa, M. D-aspartate treatment in vitro improves mouse sperm fertility in young B6N mice / M. Raspa, R. Paoletti, E. Mahabir, F. Scavizzi // *Theriogenology*. – 2020. – Vol. 148. – P. 60-67. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.031
209. Raspa, M. Effects of oral d-aspartate on sperm quality in B6N mice / M. Raspa, E. Mahabir, R. Paoletti [et al.] // *Theriogenology*. – 2018. – Vol. 121. – P. 53-61. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.040
210. Raucci, F. Stimulation of androgen production by D-aspartate through the enhancement of StAR, P450scc and 3 β -HSD mRNA levels in vivo rat testis and in culture of immature rat Leydig cells / F. Raucci, A. D'Aniello, M.M. Di Fiore // *Steroids*. – 2014. – Vol. 84. – P. 103-110. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.03.016
211. Ritz-Timme, S. Aspartic acid racemization: Evidence for marked longevity of elastin in human skin / S. Ritz-Timme, I. Laumeier, M.J. Collins // *British Journal of*

- Dermatology. – 2003. – Vol. 149. – № 5. – P. 951-959. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2003.05618.x
212. Riyat, H. Autologous fat grafting for scars, healing and pain: a review / H. Riyat, L.L. Touil, M. Briggs, K. Shokrollahi // Scars, burns & healing. – 2017. – Vol. 3. DOI: 10.1177/2059513117728200
213. Ross, R.J. Autologous fat grafting: current state of the art and critical review / R.J. Ross, R. Shayan, K.L. Mutimer [et al.] // Annals of plastic surgery. – 2014. – Vol. 73. – № 3. – P. 352-357. DOI: 10.1097/SAP.0b013e31827aeb51
214. Rubin, J.P. Discussion: percutaneous aponeurotomy and lipofilling: a regenerative alternative to flap reconstruction? / J.P. Rubin, D. Smith // Plastic and reconstructive surgery. – 2013. – Vol. 132. – № 5. – P. 1291-1292. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182a774e0
215. Sacchi, S. pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: effect on schizophrenia susceptibility / S. Sacchi, M. Bernasconi, M. Martineau [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. – № 32. – P. 22244-22256. DOI: 10.1074/jbc.M709153200
216. Sacchi, S. Olanzapine, but not clozapine, increases glutamate release in the prefrontal cortex of freely moving mice by inhibiting D-aspartate oxidase activity / S. Sacchi, V. De Novellis, G. Paolone [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-13. DOI: 10.1038/srep46288
217. Sacchi, S. Biochemical properties of human D-amino acid oxidase variants and their potential significance in pathologies / S. Sacchi, P. Cappelletti, G. Murtas // Frontiers in molecular biosciences. – 2018. – Vol. 5. – P. 55. DOI: 10.3389/fmolb.2018.00055
218. Sakai, K. D-Aspartic acid localization during postnatal development of rat adrenal gland / K. Sakai, H. Homma, J.A. Lee [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 1997. – Vol. 235. – № 2. – P. 433-436. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6783
219. Sambri, I. The microRNA 15a/16-1 cluster down-regulates protein repair isoaspartyl methyltransferase in hepatoma cells: implications for apoptosis regulation /

- I. Sambri, R. Capasso, P. Pucci [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 51. – P. 43690-43700. DOI: 10.1074/jbc.M111.290437
220. Sambuy, M.T.C. Randomized controlled trial of limited fasciotomy with injection of adipose graft for Dupuytren's Disease / M.T.C. Sambuy, H.A. Nakamoto, R. Bolliger Neto [et al.] // *Acta Ortopédica Brasileira*. – 2020. – Vol. 28. – № 4. – P. 159-164. DOI: 10.1590/1413-785220202804233522
221. Santillo, A. D-Aspartic acid implication in the modulation of frog brain sex steroid levels / A. Santillo, C. Pinelli, L. Burrone [et al.] // *General and comparative endocrinology*. – 2013. – Vol. 181. – P. 72-76. DOI: 10.1016/j.yggen.2012.11.003
222. Santillo, A. d-aspartate affects NMDA receptor-extracellular signal-regulated kinase pathway and upregulates androgen receptor expression in the rat testis / A. Santillo, S. Falvo, P. Chieffi [et al.] // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81. – № 4. – P. 744-751. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.009
223. Santillo, A. D-Aspartate induces proliferative pathways in spermatogonial GC-1 cells / A. Santillo, S. Falvo, P. Chieffi [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2015. – Vol. 231. – № 2. – P. 490-495. DOI: 10.1002/jcp.25095
224. Santillo, A. AMPA receptor expression in mouse testis and spermatogonial GC-1 cells: A study on its regulation by excitatory amino acids / A. Santillo, S. Falvo, M.M. Di Fiore [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2019. – Vol. 120. – № 7. – P. 11044-11055. DOI: 10.1002/jcb.28382
225. Santillo, A. D-Asp upregulates PREP and GluA2/3 expressions and induces p-ERK1/2 and p-Akt in rat testis / A. Santillo, M. Venditti, S. Minucci [et al.] // *Reproduction*. – 2019. – Vol. 158. – № 4. – P. 357-367. DOI: 10.1530/REP-19-0204
226. Sasabe, J. Distinctive roles of d-amino acids in the homochiral world: chirality of amino acids modulates mammalian physiology and pathology / J. Sasabe, M. Suzuki // *The Keio journal of medicine*. – 2018. – Vol. 68. – № 1. – P. 1-16. DOI: 10.2302/kjm.2018-0001-IR
227. Schell, M.J. D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles / M.J. Schell, O. Cooper, S.H. Snyder // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Vol. 94. – № 5. – P. 2013-2018. DOI: 10.1073/pnas.94.5.2013

228. Seo, B.F. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in prevention or treatment of excessive scars / B.F. Seo, S.N. Jung // *Stem cells international*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-8. Article ID: 6937976. DOI: 10.1155/2016/6937976
229. Serra-Mestre, J.M. Platelet-rich plasma mixed-fat grafting: a reasonable pro-survival strategy for fat grafts? / J.M. Serra-Mestre, J.M. Serra-Renom, L. Martinez [et al.] // *Aesthetic plastic surgery*. – 2014. – Vol. 38. – № 5. – P. 1041-1049. DOI: 10.1007/s00266-014-0374-7
230. Shi, J.H. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring / J.H. Shi, H. Guan, S. Shi [et al.] // *Archives of dermatological research*. – 2013. – Vol. 305. – № 4. – P. 341-352. DOI: 10.1007/s00403-013-1314-0
231. Simonacci, F. Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting / F. Simonacci, N. Bertozzi, M.P. Grieco [et al.] // *Annals of Medicine and Surgery*. – 2017. – Vol. 20. – P. 49-60. DOI: 10.1016/j.amsu.2017.06.059
232. Śliwka, L. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions / L. Śliwka, K. Wiktorska, P. Suchocki [et al.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11. – № 5. – P. e0155772. DOI: 10.1371/journal.pone.0155772
233. Slominski, A. Neuroendocrinology of the skin / A. Slominski, J. Wortsman // *Endocrine reviews*. – 2000. – Vol. 21. – № 5. – P. 457-487. DOI: 10.1210/edrv.23.3.9999
234. Spear, S.L. The safety, effectiveness, and efficiency of autologous fat grafting in breast surgery / S.L. Spear, C.N. Coles, B.K. Leung [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery Global open*. – 2016. – Vol. 4. – № 8. – P. 1-11. DOI: 10.1097/GOX.0000000000000842
235. Spiekman, M. The power of fat and its adipose-derived stromal cells: emerging concepts for fibrotic scar treatment / M. Spiekman, J.A. van Dongen, J.C. Willemsen [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2017. – Vol. 11. – № 11. – P. 3220-3235. DOI: 10.1002/term.2213

236. Storto, M. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis / M. Storto, M. Sallese, L. Salvatore [et al.] // *Journal of endocrinology*. – 2001. – Vol. 170. – № 1. – P. 71-78. DOI: 10.1677/joe.0.1700071
237. Sullivan, L.B. Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth / L.B. Sullivan, A. Luengo, L.V. Danai [et al.] // *Nature cell biology*. – 2018. – Vol. 20. – № 7. – P. 782-788. DOI: 10.1038/s41556-018-0125-0
238. Sun, X. Ki-67: more than a proliferation marker / X. Sun, P.D. Kaufman // *Chromosoma*. – 2018. – Vol. 127. – № 2. – P. 175-186. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8
239. Svalgaard, J.D. Lipoaspirate storage time and temperature: Effects on stromal vascular fraction quality and cell composition / J.D. Svalgaard, S. Juul, P.V. Vester-Glovinski [et al.] // *Cells Tissues Organs*. – 2020. – Vol. 209. – № 1. – P. 54-63. DOI: 10.1159/000507825
240. Szende, B.É.L.A. The effect of amino acids and amino acid derivatives on cell proliferation / B.É.L.A. Szende // *Acta Biomedica de L'Ateneo Parmense*. – 1993. – Vol. 64. – № 5-6. – P. 139-145. PMID: 7992551
241. Takahashi, S. d-Aspartate oxidase: Distribution, functions, properties, and biotechnological applications / S. Takahashi // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2020. – Vol. 104. – P. 2883-2895. DOI: 10.1007/s00253-020-10439-9
242. Takashima, A. Establishment of fibroblast cultures / A. Takashima // *Current protocols in cell biology*. – 1998. – № 1. – P. 2.1. DOI: 10.1002/0471143030.cb0201s00
243. Takigawa, Y. d-Aspartate Uptake into Cultured Rat Pinealocytes and the Concomitant Effect on d-Aspartate Levels and Melatonin Secretion / Y. Takigawa, H. Homma, J.A. Lee [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1998. – Vol. 248. – № 3. – P. 641-647. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8971
244. Tanaka-Hayashi, A. Is d-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got1l1): a putative aspartate racemase? / A. Tanaka-Hayashi, S. Hayashi, R. Inoue [et al.] // *Amino Acids*. – 2015. – Vol. 47. – № 1. – P. 79-86. DOI: 10.1007/s00726-014-1847-3

245. Terriac, E. Vimentin levels and serine 71 phosphorylation in the control of cell-matrix adhesions, migration speed, and shape of transformed human fibroblasts / E. Terriac, G. Coceano, Z. Mavajian [et al.] // *Cells*. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 2. DOI: 10.3390/cells6010002
246. Thanik, V.D. A murine model for studying diffusely injected human fat / V.D. Thanik, C.C. Chang, O.Z. Lerman [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2009. – Vol. 124. – № 1. – P. 74-81. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181a80509
247. Thomasset, N. Anti-tumoral activity of L and D isomers of aspartic acid β -hydroxamate on L5178Y leukemia / N. Thomasset, F. Hamedi-Sangsari, R. Tournaire [et al.] // *International journal of cancer*. – 1991. – Vol. 49. – № 3. – P. 421-424. DOI: 10.1002/ijc.2910490319
248. Tomita, K. The effect of D-Aspartate on spermatogenesis in mouse testis / K. Tomita, H. Tanaka, S. Kageyama [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2016. – Vol. 94. – № 2. – P. 1-7. DOI: 10.1095/biolreprod.115.134692
249. Tonnard, P. Fat Grafting for Facial Rejuvenation with Nanofat Grafts / P. Tonnard, A. Verpaele, M. Carvas // *Clinics in plastic surgery*. – 2019. – Vol. 47. – № 1. – P. 53-62. DOI: 10.1016/j.cps.2019.08.006
250. Tonnard, P. Nanofat grafting: basic research and clinical applications / P. Tonnard, A. Verpaele, G. Peeters [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2013. – Vol. 132. – № 4. – P. 1017-1026. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31829fe1b0
251. Topo, E. Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat / E. Topo, A. Soricelli, A. Di Maio [et al.] // *Amino Acids*. – 2009. – Vol. 38. – № 5. – P. 1561-1569. DOI: 10.1007/s00726-009-0369-x
252. Topo, E. The role and molecular mechanism of D-aspartic acid in the release and synthesis of LH and testosterone in humans and rats / E. Topo, A. Soricelli, A. D'Aniello [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2009. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-11. DOI: 10.1186/1477-7827-7-120
253. Topo, E. Thyroid Hormones and D-Aspartic Acid, D-Aspartate Oxidase, D-Aspartate Racemase, H₂O₂, and ROS in Rats and Mice / E. Topo, G. Fisher, A.

- Sorricelli [et al.] // *Chemistry & biodiversity*. – 2010. – Vol. 7. – № 6. – P. 1467-1478. DOI: 10.1002/cbdv.200900360
254. Tsunoda, M. Determination of aspartic acid enantiomers in bio-samples by capillary electrophoresis / M. Tsunoda, M. Kato, T. Fukushima [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 1999. – Vol. 13. – № 5. – P. 335-339. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0801(199908)13:5<335::AID-BMC868>3.0.CO;2-4
255. Usiello, A. New Evidence on the Role of D-Aspartate Metabolism in Regulating Brain and Endocrine System Physiology: From Preclinical Observations to Clinical Applications / A. Usiello, M.M. Di Fiore, A. De Rosa [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 22. – P. 8718. DOI: 10.3390/ijms21228718
256. Van Veldhoven, P.P. D-Aspartate oxidase, a peroxisomal enzyme in liver of rat and man / P.P. Van Veldhoven, C. Brees, G.P. Mannaerts // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1991. – Vol. 1073. – № 1. – P. 203-208. DOI: 10.1016/0304-4165(91)90203-S
257. Vcelar, S. Karyotype variation of CHO host cell lines over time in culture characterized by chromosome counting and chromosome painting / S. Vcelar, V. Jadhav, M. Melcher [et al.] // *Biotechnology and bioengineering*. – 2018. – Vol. 115. – № 1. – P. 165-173. DOI: 10.1002/bit.26453
258. Venditti, M. D-Aspartate Upregulates DAAM1 Protein Levels in the Rat Testis and Induces Its Localization in Spermatogonia Nucleus / M. Venditti, A. Santillo, S. Falvo [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 5. – P. 677. DOI: 10.3390/biom10050677
259. Verpaele, A. The Nanofat Method for Mechanical Stromal Vascular Fraction Isolation: Principle and Clinical Application / A. Verpaele, P. Tonnard, M. Ghiasloo // *Advances in Cosmetic Surgery*. – 2020. – Vol. 3. – № 1. – P. 209-216. DOI: 10.1016/j.yacs.2020.02.002
260. Virzì, F. Combined platelet-rich plasma and lipofilling treatment provides great improvement in facial skin-induced lesion regeneration for scleroderma patients / F. Virzì, P. Bianca, A. Giammona [et al.] // *Stem cell research & therapy*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 236. DOI: 10.1186/s13287-017-0690-3

261. Visser, W.F. A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of d-amino acids in body fluids / W.F. Visser, N.M. Verhoeven-Duif, R. Ophoff [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – Vol. 1218. – № 40. – P. 7130-7136. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.07.087
262. Vriend, L. The Therapeutic Use of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells (ASCs) in Scar Tissue and its Potential in Scar Remodelling / L. Vriend, J.A. van Dongen, B. van der Lei, H.P.J.D. Stevens // *Journal of Stem Cells Research Development & Therapy*. – 2020. – Vol. 6. – P. 036. DOI: 10.24966/SRDT-2060/100036
263. Wang, H. Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role (s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals / H. Wang, H. Wolosker, J. Pevsner [et al.] // *Journal of Endocrinology*. – 2000. – Vol. 167. – № 2. – P. 247-252. DOI: 10.1677/joe.0.1670247
264. Wang, L. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodeling / L. Wang, L. Hu, X. Zhou [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-12. DOI: 10.1038/s41598-017-12919-x
265. Wang, Y. N-methyl-D-aspartate receptor activation mediates lung fibroblast proliferation and differentiation in hyperoxia-induced chronic lung disease in newborn rats / Y. Wang, S. Yue, Z. Luo [et al.] // *Respiratory research*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 1-11. DOI: 10.1186/s12931-016-0453-1
266. Weatherly, C.A. D-Amino acid levels in perfused mouse brain tissue and blood: a comparative study / C.A. Weatherly, S. Du, C. Parpia [et al.] // *ACS chemical neuroscience*. – 2017. – Vol. 8. – № 6. – P. 1251-1261. DOI: 10.1021/acscemneuro.6b00398
267. Weil, Z.M. Behavioural alterations in male mice lacking the gene for d-aspartate oxidase / Z.M. Weil, A.S. Huang, A. Beigneux [et al.] // *Behavioural brain research*. – 2006. – Vol. 171. – № 2. – P. 295-302. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.04.008
268. Wolosker, H. D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release / H. Wolosker, A. D'Aniello, S.H. Snyder //

- Neuroscience. – 2000. – Vol. 100. – № 1. – P. 183-189. DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00321-3
269. Wu, M. Comparison of Conventional and Platelet-Rich Plasma-Assisted Fat Grafting: A Systematic Review and Meta-analysis / M. Wu, M. Karvar, Q. Liu [et al.] // Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. – 2021. DOI: 10.1016/j.bjps.2021.05.046
270. Wydau, S. Widespread distribution of cell defense against D-aminoacyl-tRNAs / S. Wydau, G. van der Rest, C. Aubard [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – № 21. – P. 14096-14104. DOI: 10.1074/jbc.M808173200
271. Xing, Y. Simultaneous determination of 18 D-amino acids in rat plasma by an ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to explore the potential relationship between Alzheimer's disease and D-amino acid level alterations / Y. Xing, X. Li, X. Guo [et al.] // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2016. – Vol. 408. – № 1. – P. 141-150. DOI: 10.1007/s00216-015-9086-3
272. Yamada, H. Functional expression of a GLT-1 type Na⁺-dependent glutamate transporter in rat pinealocytes / H. Yamada, S. Yatsushiro, A. Yamamoto [et al.] // Journal of neurochemistry. – 1997. – Vol. 69. – № 4. – P. 1491-1498. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69041491.x
273. Yamamoto, A. d-Aspartate Oxidase Localisation in Pituitary and Pineal Glands of the Female Pig / A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike // Journal of neuroendocrinology. – 2010. – Vol. 22. – № 11. – P. 1165-1172. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02066.x
274. Yamashita, M. Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma / M. Yamashita, M. Ogasawara, Y. Kawasaki [et al.] // Oncotarget. – 2018. – Vol. 9. – № 17. – P. 13287-13300. DOI: 10.18632/oncotarget.24324

275. Yuan, F.L. Epithelial–mesenchymal transition in the formation of hypertrophic scars and keloids / F.L. Yuan, Z.L. Sun, Y. Feng [et al.] // *Journal of cellular physiology.* – 2019. – Vol. 234. – № 12. – P. 21662-21669. DOI: 10.1002/jcp.28830
276. Yatsushiro, S. L-aspartate but not the D form is secreted through microvesicle-mediated exocytosis and is sequestered through Na⁺-dependent transporter in rat pinealocytes / S. Yatsushiro, H. Yamada, S. Kozaki [et al.] // *Journal of neurochemistry.* – 1997. – Vol. 69. – № 1. – P. 340-347. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69010340.x
277. Yi, C. Enhancement of viability of fat grafts in nude mice by endothelial progenitor cells / C. Yi, Y. Pan, Y. Zhen [et al.] // *Dermatologic surgery.* – 2006. – Vol. 32. – № 12. – P. 1437-1443. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2006.32351.x
278. Yoshimura, K. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation / K. Yoshimura, H. Suga, H. Eto // *Regenerative Medicine.* – 2009. – Vol. 2. – № 4. – P. 265-273. DOI: 10.2217/17460751.4.2.265
279. Yu, F. Human adipose-derived stem cells enriched with VEGF-modified mRNA promote angiogenesis and long-term graft survival in a fat graft transplantation model / F. Yu, N. Witman, D. Yan [et al.] // *Stem cell research & therapy.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-20. DOI: 10.1186/s13287-020-02008-8
280. Zaar, K. Cellular and subcellular distribution of D-aspartate oxidase in human and rat brain / K. Zaar, H.P. Köst, A. Schad [et al.] // *Journal of Comparative Neurology.* – 2002. – Vol. 450. – № 3. – P. 272-282. DOI: 10.1002/cne.10320
281. Zhang, J. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion / J. Zhang, J. Fan, S. Venneti [et al.] // *Molecular cell.* – 2014. – Vol. 56. – № 2. – P. 205-218. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.08.018
282. Zhao, Y.Y. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes / Y.Y. Zhao, D.J. Yan, Z.W. Chen // *Cellular immunology.* – 2013. – Vol. 284. – № 1-2. – P. 75-83. DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.07.008
283. Zhao, G. MSC-derived exosomes attenuate cell death through suppressing AIF nucleus translocation and enhance cutaneous wound healing / G. Zhao, F. Liu, Z. Liu [et

al.] // Stem cell research & therapy. – 2020. – Vol. 11. – P. 1-18. DOI: 10.1186/s13287-020-01616-8

284. Zheng, G. Human D-Tyr-tRNATyr deacylase contributes to the resistance of the cell to D-amino acids / G. Zheng, W. Liu, Y. Gong [et al.] // Biochemical Journal. – 2009. – Vol. 417. – № 1. – P. 85-97. DOI: 10.1042/BJ20080617

285. Zhong, W. Adipose specific aptamer adipo-8 recognizes and interacts with APMAP to ameliorates fat deposition in vitro and in vivo / W. Zhong, Y. Zhang, W. Tan [et al.] // Life sciences. – 2020. – Vol. 251. – P. 117609. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117609

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2710718

**Способ модификации пролиферативной активности
клеточных культур млекопитающих**

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) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019102300

Приоритет изобретения 28 января 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 10 января 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 января 2039 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

Авторы: *Трофименко Артем Иванович (RU), Гилевич Ирина Валериевна (RU), Федоренко Татьяна Владимировна (RU), Коломийцева Елена Анатольевна (RU), Порханов Владимир Алексеевич (RU), Поляков Игорь Станиславович (RU), Богданов Сергей Борисович (RU), Цуров Алаудин Бесланович (RU), Сергеева Юлия Анатольевна (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2691647

**Средство для профилактики образования патологических
кожных рубцов**

Патентообладатели: *Трофименко Артем Иванович (RU), Гилевич
Ирина Валериевна (RU), Каде Азамат Халидович (RU), Цуров
Алаудин Бесланович (RU), Богданов Сергей Борисович (RU),
Кузьмина Елена Андреевна (RU), Зиннатуллина Диана
Ильдаровна (RU), Пономаренко Тамара Владимировна (RU),
Сергеева Юлия Анатольевна (RU), Липатова Аксинья
Сергеевна (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018142203

Приоритет изобретения **29 ноября 2018 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **17 июня 2019 г.**

Срок действия исключительного права

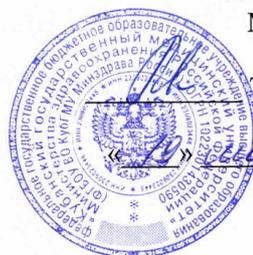
на изобретение истекает **29 ноября 2038 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России



Т.В. Гайворонская

_____ 2021 г.

АКТ

об использовании предложения в учебном процессе

Наименование предложения: «Алгоритм оценки пролиферативной активности фибробластов на фоне применения D-аминокислот».

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Подготовка тканей перед проведением липофилинга применением D-аспарагина (экспериментальное исследование)».

Исполнитель: заочный аспирант ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России Юлия Анатольевна Сергеева.

Научный руководитель: патологическая физиология – заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Азамат Халидович Каде.

Дата использования предложения: с мая 2021 года.

Основные результаты использования и их практическая значимость: Предложенный алгоритм на основе комплексной оценки времени удвоения популяции клеток, результатов цитологического (окраска по Романовскому-Гимзе) и иммуноцитохимического исследований (Ki-67) позволяет надежно верифицировать изменения пролиферативной активности фибробластов *in vitro*.

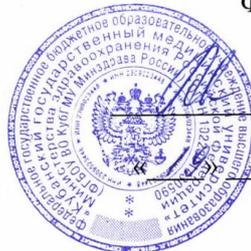
Заведующий кафедрой
фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Автор предложения

И.М. Быков

Ю.А. Сергеева

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России



Т.В. Гайворонская

Т.В. Гайворонская 2021 г.

АКТ

об использовании предложения в учебном процессе

Наименование предложения: «Влияние D-аспарагина на пролиферативную активность соматических клеток млекопитающих».

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Подготовка тканей перед проведением липофилинга применением D-аспарагина (экспериментальное исследование)».

Исполнитель: заочный аспирант ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России Юлия Анатольевна Сергеева.

Научный руководитель: патологическая физиология – заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Азамат Халидович Каде.

Дата использования предложения: с июня 2021 года.

Основные результаты использования и их практическая значимость: Использование материалов работы для проведения занятий и лекций на кафедре биологии с курсом медицинской генетики со студентами и ординаторами в рамках дисциплин «Биология», «Медицинская генетика», «Молекулярная генетика».

Заведующий кафедрой биологии
с курсом медицинской генетики
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Автор предложения

И.И. Павлюченко

Ю.А. Сергеева

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России

Т.В. Гайворонская

шае 2021 г.

АКТ

об использовании предложения в учебном процессе

Наименование предложения: «D-аспарагин как модулятор ремоделирования раневых поверхностей».

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Подготовка тканей перед проведением липофилинга применением D-аспарагина (экспериментальное исследование)».

Исполнитель: заочный аспирант ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России Юлия Анатольевна Сергеева.

Научный руководитель: патологическая физиология – заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Азамат Халидович Каде.

Дата использования предложения: с января 2021 года.

Основные результаты использования и их практическая значимость: Использование материалов работы для проведения занятий и лекций на кафедре общей и клинической патологической физиологии со студентами и ординаторами в рамках дисциплин «Патологическая физиология», «Патофизиология. Клиническая патофизиология».

Заведующий кафедрой
общей и клинической
патологической физиологии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

А.Х. Каде

Автор предложения

Ю.А. Сергеева