



Анна Куприянова

врач-дерматолог,  
косметолог, руководитель  
учебного центра Hyalual,  
Москва.



Юлия Кирова

д. б. н., главный научный  
сотрудник лаборатории  
биоэнергетики и проблем  
гипоксии ФГБНУ НИИ  
общей патологии  
и патофизиологии, Москва.

# Наукой доказано

Цитобиохимическое обоснование ремоделирующего действия Hyalual® в коже.

## Введение

Исследование эффектов сукцината, реализуемых через специфический рецептор SUCNR1 (GPR91), было начато в 2004 году, когда сукцинатный рецептор был идентифицирован в клетках почек как стимулятор секреции ренина (He W. et al., 2004).

Согласно современным представлениям, янтарная кислота (Hyalual®) является молекулярным маркером гипоксических/ишемических состояний и продуцируется митохондриями не только в ходе прямого окислительного развития цикла Кребса (при достаточном уровне O<sub>2</sub> в клетке), но и в ходе восстановительного обращения цикла Кребса при гипоксии (Ariza A. C. et al., 2012). Срочные антигипоксические SUCNR1-зависимые эффекты янтарной кислоты могут реализовываться локально в участке ишемизированной ткани по типу аутокринного/паракринного сигнала (вазодилатация) (Hamel D. et al., 2014; Toma I. et al., 2008), а также на системном уровне (секреция ренина почками, увеличение артериального давления) (He W. et al., 2004; Toma I., 2008).

Исследования активности SUCNR1 проводились на ткани почек (He W. et al., 2004; Toma I., 2008), сердца (Aguilar C. J. et al., 2010), мозга (Hamel D. et al., 2014; Sapieha P. et al., 2008), сетчатки глаза (Sapieha P., 2012), печени и практически не затронули кожу, в то время как положительные эффекты сукцинатсодержащего препарата (Hyalual®), применяемого в дерматологии и косметологии, хорошо известны и заключаются в ускорении заживления ран, омоложении кожи (Bogumand M., 2015; Domingoa J. L. et al., 1988; Zarubina I. V. et al., 2012), устранении гиперпигментации (Denton C. R. et al., 1952; Yasuda M. et al., 1995), противовоспалительном и противоаллергическом действиях (Boyle J. et al., 1986).

В связи с необходимостью обоснования легитимности практического применения с целью восстановления репаративных свойств кожи сукцинатсодержащего препарата Hyalual® на базе лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии (Москва) было инициировано исследование.

Цель этого исследования состояла в выявлении возможных SUCNR1-опосредованных механизмов активности сукцинатсодержащего препарата Hyalual® в коже. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- провести выявление SUCNR1 в образцах кожи интактных крыс и перенесших курс внутрикожных инъекций сукцинатсодержащего препарата Hyalual®, используя метод Вестерн-блот анализа,
- идентифицировать SUCNR1-положительные клетки кожи, используя метод иммуногистохимии,
- оценить количество и морфологические особенности клеток кожи в контрольной и опытной группах.

## Материалы и методы

Использованные препараты (субстанции): сукцинатсодержащий препарат Hyalual® (препарат для курсовой процедуры редермализации, инъекционная форма; концентрация гиалуроновой кислоты 1,1%, 1,8%, 2,2%; содержание сукцината 1,6%), мексидол (инъекционная форма, 50 мг/мл), физраствор (инъекционная форма), 1,6% раствор сукцината натрия, чистая высокомолекулярная гиалуроновая кислота концентрацией 1%, 1,8%, 2%.

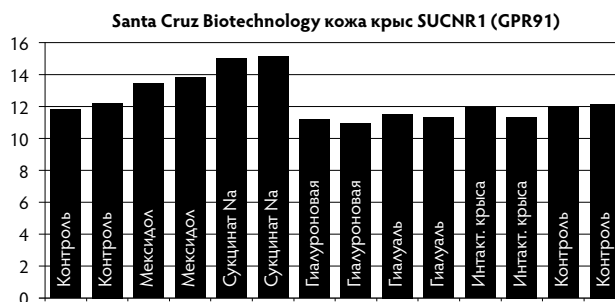
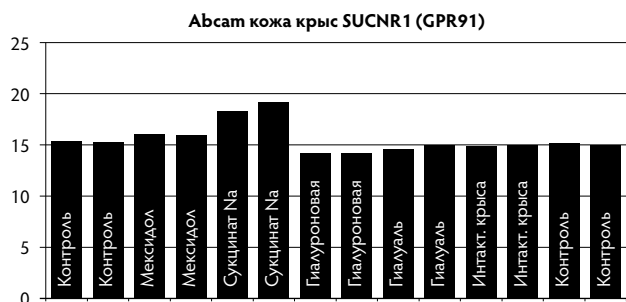


Рис. 1. Фотографии и данные количественной оценки иммуноблотов образцов лизатов кожи передней брюшной стенки крыс после трёхкратного внутривенного введения сукцинатсодержащих препаратов (Hyalual®, мексидол, сукцинат натрия (Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)).

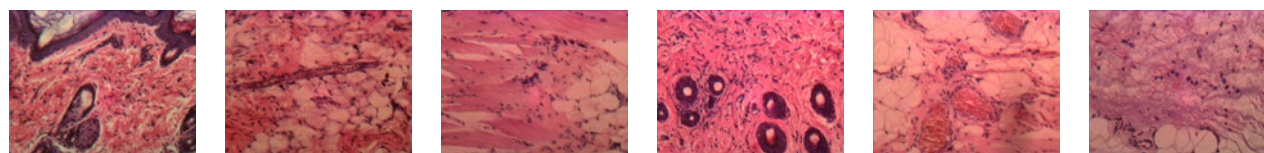


Рис. 2. Микрофотографии поперечных срезов кожи передней брюшной стенки крыс, инъецированных физраствором (a, b, c) и препаратом Hyalual® (d, e, f). Окрашивание гематоксилин-эозином. Увеличение 200.

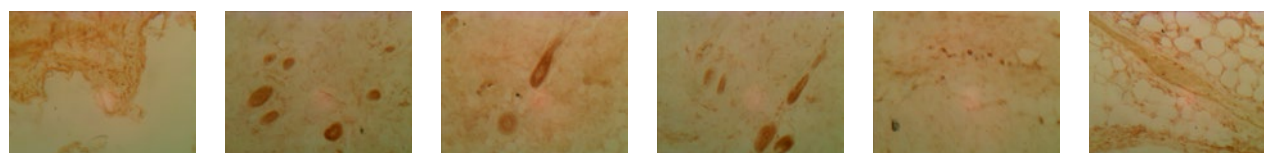


Рис. 3. Микрофотографии поперечных срезов кожи передней брюшной стенки крыс, инъецированных физраствором (контроль). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к SUCNR1. Увеличение 200.

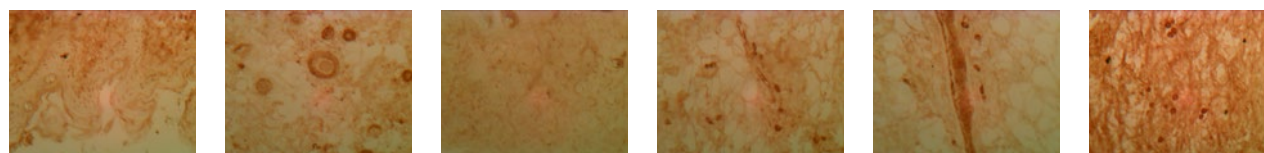


Рис. 4. Микрофотографии поперечных срезов кожи передней брюшной стенки крыс, инъецированных препаратом Hyalual® (опыт). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к SUCNR1. Увеличение 200.

Методы идентификации и визуализации данных:

- иммуноблоттинг (Вестерн-блот анализ) — позволяет, сочетая белковый электрофорез и применение антител, проводить высокоспецифичную идентификацию белков в образцах биологических тканей,
- гистологическая обработка кожи — позволяет визуализировать искомые объекты в тканях после обработки антителами и окрашивания,
- иммуноцитохимический метод — метод идентификации в клетке различных белков, основанный на реакции «антиген-антитело». Метод был использован для определения содержания белков SUCNR1 в поперечных срезах кожи передней брюшной поверхности.

## Результаты и обсуждение

Метод Вестерн-блот анализа позволил выявить SUCNR1 в образцах кожи передней брюшной стенки крыс всех экспериментальных групп: интактной (без воздействий), контрольной (инъекции физраствора), опытной (инъекции препарата Hyalual®), группы сравнения I (инъекции гиалуриновой кислоты), группы сравнения II (инъекции мексидола), группы сравнения III (инъекции раствора сукцината Na). Трёхкратное введение препаратов с двухнедельными интервалами согласно стандартной схеме не влияло на уровень рецептора, который не отличался от базового (в коже интактных крыс) [Рис. 1]. Факт отсутствия снижения уровня SUCNR1 после применения Hyalual® может свидетельствовать о выборе адекватной дозы, при отмене которой риск развития зависимости от препарата и синдрома отмены минимален.

Окрашивание срезов кожи гематоксилин-эозином.

Для окрашивания были получены поперечные срезы дермы (сосочковый, сетчатый слои) и гиподермы кожи передней брюшной стенки контрольных (инъекции физраствора) и опытных (инъекции Hyalual®) крыс. В дерме контрольных животных было выявлено высокое содержание фибробластов веретеновидной формы [Рис. 2a, b], макрофаги и тучные клетки [Рис. 2b, c]. В сравнении с контролем в срезах кожи опытных животных количество фибробластов возросло [Рис. 2d], а морфология этих клеток изменилась (увеличение размеров и количества отростков), что свидетельствует об их активации. Следует отметить, что стимуляция пролиферации фибробластов сукцинатом в сочетании с гиалуриновой кислотой отмечается и в других исследованиях (Bogumand M., 2015). Также на срезах кожи опытных крыс выявлялись признаки вазодилатации и увеличения плотности сосудистой сети [Рис. 2e].

Иммуногистохимическое окрашивание срезов кожи контрольных и опытных крыс с применением антител к SUCNR1 показало, что клеточные элементы кожи (кератиноциты, фибробласты, макрофаги, тучные клетки, глад-

**Внутрикожное введение препарата Hyalual® и препаратов сравнения проводилось трёхкратно с двухнедельными перерывами.**

## Литература

1. Aguiar C.J., Andrade V.L., Gomes E.R., Alves M.N., Ladeira M.S., Pinheiro A.C., Gomes D.A., Almeida A.P., Goes A.M., Resende R.R., Guatimosim S., Leite M.F. Succinate modulates Ca (2+) transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium*, 2010, v. 47, № 1. P. 37–46.
2. Ariza A.C., Deen P.M. T., Robben J.H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Frontiers in Endocrinology, Molecular and Structural Endocrinology*, 2012, v. 3. P. 1–8.
3. Behm B., Babilas P., Landthaler M., Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2012, 26. P. 812–820.
4. Borumand M. Combination treatment with hyaluronic acid, succinate, and collagen: a novel approach to skin rejuvenation. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.*, 2015, 6:3.
5. Boyle J., Burton J.L., Faergemann J. Use of topical lithium succinate for seborrheic dermatitis. *British Medical Journal*, 292, 28 (1986).
6. Correa P.R., Kruglov E.A., Thompson M., Leite M.F., Dranoff J.A., Nathanson M.H. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J. Hepatol.*, 2007, v. 47, № 2. P. 262–269.
7. Denton C.R., Lerner A.B., Fitzpatrick T.B. Inhibition of Melanin Formation by Chemical Agents. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1952, 18. P. 119–135.
8. Domingoa J. L., Gómeza M., Llobeta J.M., Corbellab J. Citric, malic and succinic acids as possible alternatives to deferroxamine in aluminum toxicity. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 1988, 26 (1–2).
9. Freundlich B., Bomalaski J.S., Neilson E., Jimenez S.A. Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunol. Today*, 1986, 7 (10). 303–7.
10. Hakak Y., Lehmann-Bruinsma K., Phillips S., Le T., Liaw C., Connolly D.T., Behan D.P. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, v. 85, № 5. P. 837–843.
11. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honoré J.-C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallée M., Hou X., Lavoie J.C., Mitchell G., Mammer O.A., Chentob S. G-protein — coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, v. 34, № 2. P. 285–293.
12. Hamel, D. et al. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, 34. P. 285–293.
13. He W., Miao F.J. P., Lin D.C. H., Schwandner R. T., Wang Z., Gao J., Chen J.L., Tian H., Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2004, v. 429, №6988. P. 188–193.
14. Juráňová J., Franková J., Ulrichová J. The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine*, 2017, 15. P. 169–179.
15. Ko S.H., Choi G.E., Oh J.Y., Lee H.J., Kim J.S., Chae C.W., Choi D., Han H.J. Succinate promotes stem cell migration through the GPR91-dependent regulation of DRP1-mediated mitochondrial fission. *Scientific reports*, 2017, 7:12582, 1–4.
16. Konger R.L., Malaviya R., Pentland A.P. Growth regulation of primary human keratinocytes by prostaglandin E receptor EP2 and EP3 subtypes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1401. P. 221–234.
17. Leon A., Buriani A., Dal-Toso R. et al. Mast cells synthesize, store and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91, 1994, 3739.
18. Li, Y. H., Woo, S. H., Choi, D. H., Cho, E.-H. Succinate causes  $\alpha$ -SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, 463. P. 853–858.
19. Lynch S.E., Nixon J.C., Colvin R.B., Antoniadis H.N. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84, 1987, 7696.
20. Mills E., O'Neill L.A. J. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell. Biol.*, 2014, 24.
21. Nimni M.E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*, 1997, 18:1201.
22. Palazzo E., Marconi A., Truzzi F., Dallaglio K., Petrachi T., Humbert P., Schnebert S., Perrier E., Dumas M., Pincelli C. Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. *J. Cell. Physiol.*, 2012, 227 (3). P. 1017–1025.
23. Pierce G.F. et al. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *J. Exp. Med.*, 1994, 179:831.
24. Pincelli C., Sevigiani C., Manfredini R. et al. Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 1994, 103, 13.
25. Rubic T., Lametschwandner G., Jost S., Hinteregger S., Kund J., Carballido-Perrig N., Schwärzler C., Jung T., Voshol H., Meingassner J.G. et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.*, 2008, v. 9, №11. P. 1261–1269.
26. Santambrogio L., Benedetti M., Chao M.V. et al. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J. Immunol.*, 1994, 153, 4488.
27. Sapieha P. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood*, 2012, v. 120, №11. P. 2182–2194.
28. Sapieha P., Sirinyan M., Hamel D., Zaniolo K., Joyal J.-S., Cho J.-H., Honoré J.-C., Kermorvant-Duchemin E., Varma D.R., Tremblay S. et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature Medicine*, 2008, v. 14, №10. P. 1067–1076.
29. Suter M.M., Schulze K., Bergman W., Welle M., Roosje P., Müller E.J. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet. Dermatol.* 2009, 20. P. 515–532.
30. Toma I., Kang J.J., Sipos A., Vargas S., Bansal E., Hanner F., Meer E., Peti-Peterdi J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and rennin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.*, 2008, v. 118, № 7. P. 2526–2534.
31. Yasuda M., Yamasaki K., Ohtaki H. Stability of Complexes of Several Carboxylic Acids Formed with Bivalent Metals. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1960, 33 (8). P. 1067–1070.
32. Zarubina I.V., Lukk M.V., Shabanov P.D. Antihypoxic and antioxidant effects of exogenous succinic acid and aminothiolsuccinate-containing antihypoxants. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, 153 (3). P. 336–9.

комышечные клетки, эндотелиоциты) в разной степени экспрессируют рецептор [рис. 3], а наиболее высокие уровни SUCNR1 были выявлены в тучных клетках, нейтрофилах и макрофагах [рис. 3е, ф]. Интенсивность экспрессии SUCNR1 не менялась после завершения курса введения Hyalual® [рис. 4].

Данные морфологического и иммуногистохимического исследований свидетельствуют о реализации SUCNR1-зависимых механизмов активности сукцинатсодержащего препарата Hyalual®. В связи с тем, что рецептор в больших количествах экспрессируется в макрофагах, тучных клетках, нейтрофилах, можно предположить не только прямое влияние Hyalual® на фибробласты и кератиноциты кожи (активация, пролиферация, миграция), например, через продукцию PGE2 (Konger R.L. et al., 1998; Toma I. et al., 2008), но и опосредованное иммунными клетками, как более чувствительными сенсорами уровня сукцината.

Известно, что активация кератиноцитов и переключение с неактивного статуса на миграционный, пролиферативный, провоспалительный, происходит под действием провоспалительных цитокинов (Behm V. et al., 2012), секретируемых макрофагами и тучными клетками. NGF, TGF, VEGF, продуцируемые макрофагами, тучными клетками, лимфоцитами (Leon A. et al., 1994; Pincelli C. et al., 1994; Santambrogio L. et al., 1994), играют критическую роль в пролиферации и миграции дермальных фибробластов, ремоделировании тканей и заживлении ран (Palazzo E. et al., 2012). Макрофагальный PDGF является митогеном и хемотаксическим агентом для фибробластов, гладкомышечных клеток и воспалительных клеток (Lynch S.E. et al., 1987). Макрофаги продуцируют растворимые медиаторы, регулирующие миграцию, пролиферацию и синтез коллагена фибробластами (Freundlich V. et al., 1986).

## Заключение

Таким образом, полученные данные говорят о больших возможностях препарата Hyalual® для решения многочисленных задач в репаративной медицине, косметологии и пластической хирургии, трихологии. Наличие рецептора к сукцинату (SUCNR1) на поверхности практически всех дермальных компонентов (фибробластов, тучных клеток, макрофагов, эндотелиоцитов) свидетельствует о вовлечённости сукцинатсодержащего препарата (Hyalual®) в функциональную активацию клеток кожи, пролиферацию, миграцию, секрецию ростовых факторов, цитокинов, хемокинов. То есть причастности Hyalual® к механизмам регенерации, обновления и репарации кожи.

Полученные данные также согласуются с недавними исследованиями, начатыми в 2016 г., доказавшими сопряжение метаболизма и сигнальной функции сукцината с иммунной и репаративной функцией резидентных макрофагов в коже, поскольку они пролиферируют, мигрируют в области повышения концентрации сукцината (Hyalual®) (Dierpen, 2017), где стимулируют пролиферацию фибробластов, ангиогенез, подавление механизмов воспаления.

Применение сукцинатсодержащего препарата (Hyalual®) может рассматриваться как эффективный подход в коррекции возрастных изменений кожи, связанных с активацией механизмов воспаления, снижением репаративного и пролиферативного потенциалов кожи и подлежащих тканей. ○