

УДК 616-001.41

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 90 БЕТА (БТШ90β) НА СКОРОСТЬ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ У МЫШЕЙ

© 2021 г. В. К. Жалимов*, @, Ю. Ю. Скарга*, Ю. В. Грицына**, О. С. Моренков*

*Институт биофизики клетки РАН, Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290 Россия

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290 Россия

@E-mail: vitaly.zhalimov@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2019 г.

После доработки 06.08.2020 г.

Принята к публикации 09.11.2020 г.

Отмечено, что альфа-изоформа белка теплового шока 90 (БТШ90α) играет важную роль в ранозаживлении, оказывая стимулирующее действие на миграцию и инвазию клеток в области раны, а роль бета-изоформы БТШ90 (БТШ90β) в процессе ранозаживления до конца не определена. Получен и охарактеризован рекомбинантный БТШ90β человека, экспрессированный в *Escherichia coli*. С использованием эксцизионной модели ранозаживления на мышах, установлено, что внесение в раневую область очищенного рекомбинантного БТШ90β приводит к увеличению скорости ранозаживления на 28% по сравнению с контролем. Это позволяет рассматривать БТШ90β в качестве перспективного препарата ранозаживляющего действия.

DOI: 10.31857/S0002332921030188

В настоящий момент ~25% больных сахарным диабетом страдают от хронических ран, включая язвы с преимущественно венозным стазом, пролежни и диабетические (нейропатические) язвы (Crandall, 2003; Singh *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2009). При этом отсутствуют эффективные методы лечения таких хронических ран.

Долгое время считалось, что различные факторы роста могут быть использованы для ускорения процесса ранозаживления (Nom, Maisel, 1992). Однако оказалось, что такого рода препараты могут стимулировать злокачественные опухоли у пациентов, в связи с чем в настоящее время только препарат человеческого рекомбинантного тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) допущен к применению ВОЗ и FDA (LeGrand, 1998). Тем не менее даже после применения этого препарата сохраняется риск стимулирования развития злокачественных неоплазий (Cheng *et al.*, 2011). В настоящее время не прекращается поиск других безопасных стимуляторов процесса ранозаживления у пациентов с хроническими незаживающими ранами (например, при диабетах и ожогах).

В литературе подробно описаны ранозаживляющие свойства внеклеточного БТШ90α, основанные на ускорении миграции фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток (Li *et al.*, 2007; Woodley *et al.*, 2009, 2015; Cheng *et al.*, 2011).

Секрецию и/или транслокацию БТШ90 на поверхность клеточной мембраны стимулируют различные стрессовые воздействия: окислительный стресс (Liao *et al.*, 2000), гипоксия (Li *et al.*, 2007; Ramteke *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2016), тепловой шок (Clayton *et al.*, 2005), повреждение ДНК вследствие ионизирующего облучения (Yu *et al.*, 2006), влияние химиотерапевтических агентов (Yang *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2012), ростовых факторов (Cheng *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010; Gopal *et al.*, 2011), а также сигнальных молекул (Lei *et al.*, 2007). Стимуляция мембранной экспрессии и секреции БТШ90 клетками при стрессовых воздействиях свидетельствует в пользу важной протекторной роли внеклеточного БТШ90. Подтверждение роли внеклеточного БТШ90 в ранозаживлении продемонстрировано в экспериментах *in vivo*, свидетельствующих, что внеклеточный БТШ90 стимулирует реэпителизацию и застание ран у мышей гораздо эффективнее, чем препарат человеческого рекомбинантного тромбоцитарного фактора роста (Li *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011).

На модели застания кожного покрова у мышей и свиней показано, что нанесение в область раны фрагмента рекомбинантного БТШ90α (F-5-фрагмент, аминокислоты с 236-й по 350-ю) существенно снижало время застания раны как у нормальных, так и у диабетических животных

(Cheng *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2014). Кроме этого F-5 предотвращает прогрессирование ожоговой раны у свиней (Bhatia *et al.*, 2016).

Известно, что процесс ранозаживления у человека неотделимо связан с процессами миграции кератиноцитов и фибробластов в раневую область (Martin, 1997). Было показано, что БТШ90 α и БТШ90 β участвуют в процессах миграции и инвазии клеток (Schmitt *et al.*, 2007; Tsutsumi, Neckers, 2007; Yang *et al.*, 2008; Sidera, Patsavoudi, 2009; Snigireva *et al.*, 2015). Миграция клеток – фундаментальный биологический процесс, характерный как для нормальных клеток (миграция клеток при ангиогенезе, морфогенезе, восстановлении и регенерации тканей, миграция моноцитов из крови в очаг инфекции), так и для опухолевых клеток (Condeelis *et al.*, 2005; Sahai, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2005). Миграция клеток представляет собой сложный и многоэтапный процесс, состоящий из нескольких последовательных шагов: от воздействия на клетки специфических цитокинов (мотогенов, которые включают в себя каскад внутриклеточных сигналов, приводящих к изменениям цитоскелета), и контактных взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ), а также между собой до приобретения клетками характерного “локомоторного” фенотипа и движения клеток по субстрату (Levine *et al.*, 1995; Lauffenburger, Hogwitz, 1996). Миграция клеток требует динамического взаимодействия между клетками и субстратом, к которому клетки прикреплены и по которому осуществляется миграция. Растущие выпячивания достигают ВКМ и связываются с ним посредством молекул адгезии (Bozzuto *et al.*, 2010). Инвазия – процесс миграции клеток через ВКМ. Инвазия нормальных клеток наблюдается в процессах эмбрионального развития, при ангиогенезе, в процессе инфильтрации очага воспаления макрофагами (Sordat *et al.*, 1990; Burger, Dayer, 2007). Три неотъемлемых компонента инвазивного роста – адгезия клеток на окружающие структуры ВКМ, протеолиз в месте адгезии и миграция клеток. В адгезии клеток на структуры ВКМ и в процессе миграции клеток принимают участие те же молекулярные механизмы, что и при обычной клеточной миграции. Протеолиз ВКМ в месте адгезии характерен только для инвазии, но не для миграции клеток. Инвазия клеток начинается с прикрепления к компонентам базальной мембраны или подлежащей соединительной ткани в зоне инвазивного роста клеток. Инвазирующие клетки разрушают окружающие структуры ВКМ, вырабатывая протеазы либо стимулируя выработку протеаз фибробластами. Далее инвазирующие клетки мигрируют по образовавшемуся “коридору” (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1997).

Различные стимулы, присутствующие в микроокружении регенерируемой ткани, усиливают

секрецию БТШ90. Ли с соавт. показали, что гипоксия и трансформирующий ростовой фактор α (ТРФ α) (появляется только при повреждении кожи) индуцируют секрецию БТШ90 α , но не БТШ90 β , клетками кожи (Li *et al.*, 2007, 2012; Cheng *et al.*, 2008; Woodley *et al.*, 2009). Компоненты ВКМ, в том числе и фибронектин, также способны стимулировать секрецию БТШ90 эндотелиальными клетками в процессе ранозаживления (Song, Luo, 2010). Показано, что БТШ90 α усиливает миграцию дермальных фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток, в том числе и ТРФ α -опосредованную миграцию кератиноцитов, и способствует реэпителизации ран (Li *et al.*, 2007, 2012; Cheng *et al.*, 2008; Woodley *et al.*, 2009). Следует отметить, что миграция клеток в области раны осложнена активной секрецией трансформирующего ростового фактора бета (ТРФ β -3), который ингибирует миграцию дермальных фибробластов и эндотелиальных клеток, что связано с экспрессией рецепторов к ТРФ β -3 на этих клетках, но не на кератиноцитах (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Ростовые факторы (ТРФ α , фактор роста тромбоцитов и фактор роста эндотелия сосудов) не способны преодолеть этот ингибирующий эффект ТРФ β -3 (Li *et al.*, 2007). Однако внеклеточный БТШ90 способен стимулировать миграцию всех трех основных типов клеток кожи (кератиноциты, фибробласты, клетки эндотелия капилляров) и преодолевать ингибирующий эффект трансформирующего ростового фактора ТРФ β -3 на миграцию дермальных фибробластов и эндотелиальных клеток (Li *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008). Таким образом, применение БТШ90 для стимуляции ранозаживления имеет определенные преимущества по сравнению с другими подходами (например, факторами роста): БТШ90 в отличие от ростовых факторов стимулирует только клеточную подвижность, но не пролиферацию клеток (Li *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008).

Влияние БТШ90 α на подвижность клеток описано во многих (более 300) научных статьях. При этом только в одной из них показано, что, несмотря на то что БТШ90 α и БТШ90 β имеют высокий уровень гомологии (~86%), эффекты БТШ90 β на процесс ранозаживления у свиней оказались слабее, чем эффекты БТШ90 α (Jayaprakash *et al.*, 2015). При этом свиньи в отличие от мышей менее распространены в качестве модельных животных при исследовании ранозаживления, что не позволяет делать прямые сравнения полученных ими результатов с результатами других экспериментов, поставленных на мышах. Также стоит отметить, что процессы ранозаживления у человека преимущественно обусловлены процессами миграции клеток, в то время как у лабораторных мышей ключевую роль играет контракция кожного покрова (Sullivan *et al.*, 2001; Orgill, Blanco, 2009). В связи с этим наиболее подходя-

шая модель при исследовании влияния БТШ90β на ранозаживление — эксцизионная модель с применением поддерживающей шины (Wang *et al.*, 2013). Данная модель позволяет полностью устранить влияние контракции на размер раневой поверхности, что дает максимальное приближение к процессу ранозаживления у человека.

Цель работы — оценка влияния внеклеточного рекомбинантного БТШ90β человека на процессы ранозаживления у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного БТШ90β. Ген человеческого БТШ90β был получен из клеток фибросаркомы человека HT1080. Для выделения гена использовали следующую пару праймеров: F 5'-ТТАСАТАТGCCTGAGGAAGTGCACCATGGAG и R 5'-АТСГТСГАСАТСГАСТТСТТССАТGCGAGAC, в качестве матрицы использовали кДНК. Полученный ПЦР-фрагмент встраивали в вектор pET28b. Вектором со вставкой трансформировали *Escherichia coli* (штамм Rosetta (DE3), Novagen, США). Экспрессию синтеза белка индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-тиогалактозида (Sigma, США). Биомассу осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 5000 g. Для выделения белка использовали металл-хелатную хроматографию с применением Ni-NTA-агарозы (Thermo Scientific, США). Чистоту полученного белка оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.

Иммуноферментный анализ. Анализ реактивности рекомбинантного БТШ90β человека с БТШ90-специфическими моноклональными антителами проводили с помощью непрямого ИФА. В качестве контрольного антигена использовали нативный БТШ90, очищенный из мозга быка (смесь α- и β-изоформ БТШ90) (Skarga *et al.*, 2009). Антигены для анализа сорбировали при концентрации 1 мкг/мл.

Определение миграции и инвазии клеток in vitro. Миграцию и инвазию исследовали на клетках фибросаркомы человека HT1080. Эксперименты проводили с использованием вкладышей в 24-луночные планшеты с полиэфирной трековой (ПЭТ) мембраной (размер пор 8 мкм) (Geringer, Австрия). Для оценки инвазии клеток вкладыши с ПЭТ-мембраной обрабатывали коллагеном VI в соответствии с рекомендациями изготовителя (Trevigen, США). Перед экспериментом клетки выдерживали в среде ДМЕМ, содержащей 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), в течение 20 ч при 37°C. Клетки снимали с подложки трипсином, промывали в ДМЕМ-БСА и помещали во вкладыши в среде ДМЕМ-БСА в присутствии или в отсутствие рекомбинантного БТШ90β или контрольного нативного БТШ90. В качестве хемо-

аттрактанта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5%-ную ЭБС (эмбриональная бычья сыворотка). Миграцию и инвазию клеток оценивали через 6 и 24 ч соответственно. Прошедшие через ПЭТ-мембрану клетки фиксировали метиловым спиртом, окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым, лизировали, переносили в лунки 96-луночного планшета, после чего измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм (ОП₅₉₅). Миграцию и инвазию оценивали по ОП₅₉₅ клеток, мигрировавших через мембрану, за вычетом ОП₅₉₅ клеток, прошедших через мембрану в отсутствие хемотаксического градиента (спонтанная миграция и инвазия). Стимулирующее влияние рекомбинантного белка оценивали относительно контрольных нестимулированных клеток и выражали в процентах.

Модель шинированной раны. Для экспериментов использовали самцов мышей линии BALB/c в возрасте 4–4.5 недель ($n = 15$ в каждой группе). Раневую поверхность у мышей формировали по эксцизионной модели с применением поддерживающей шины (Wang *et al.*, 2013). Животных наркотизировали раствором золетила и ксилазина (1 : 2, 1 мл/кг). После полной потери двигательных рефлексов со спины и боков выстригали шерсть. Оставшийся волосяной покров удаляли с применением депилирующего крема (Veet, Франция). На следующий день животных повторно усыпляли, на кожу наносили два сквозных отверстия диаметром 5 мм с помощью специальных пробойников (Medax, Италия). На полученные отверстия с помощью клея на основе этилцианоакрилата (Henkel, Германия) наклеивали диски диаметром 19 мм (ширина внутреннего отверстия 8 мм, длина 10 мм), изготовленные из силиконовых листов толщиной 0.5 мм (Grace Bio-labs, США). Диски дополнительно фиксировали четырьмя хирургическими швами с использованием полигликолид-капролактоновой нити (ПТО Медтехника, Россия). В каждое сформированное раневое отверстие вносили по 20 мкл БТШ90β с концентрацией 1 мг/мл для опытных животных или фосфатно-солевой буферный раствор для контрольных животных. Затем весь диск накрывали прозрачным пластырем Tegaderm (3М, США). Животных дополнительно укрывали хирургическим бандажом (Matopat, Poland). Каждому животному надевали зоологический воротник, изготовленный по технологии FDM 3D-печати. Обработанных таким образом животных помещали в индивидуальные клетки. Каждые 4 дня на раны наносили новую порцию раствора БТШ90β или фосфатно-солевого буферного раствора.

Анализ скорости ранозаживления у мышей. Все снимки приводились к одному масштабу. Площадь раны выделяли инструментом “Лассо” и считывали ее в пикселях в разделе “Гистограммы” (программа

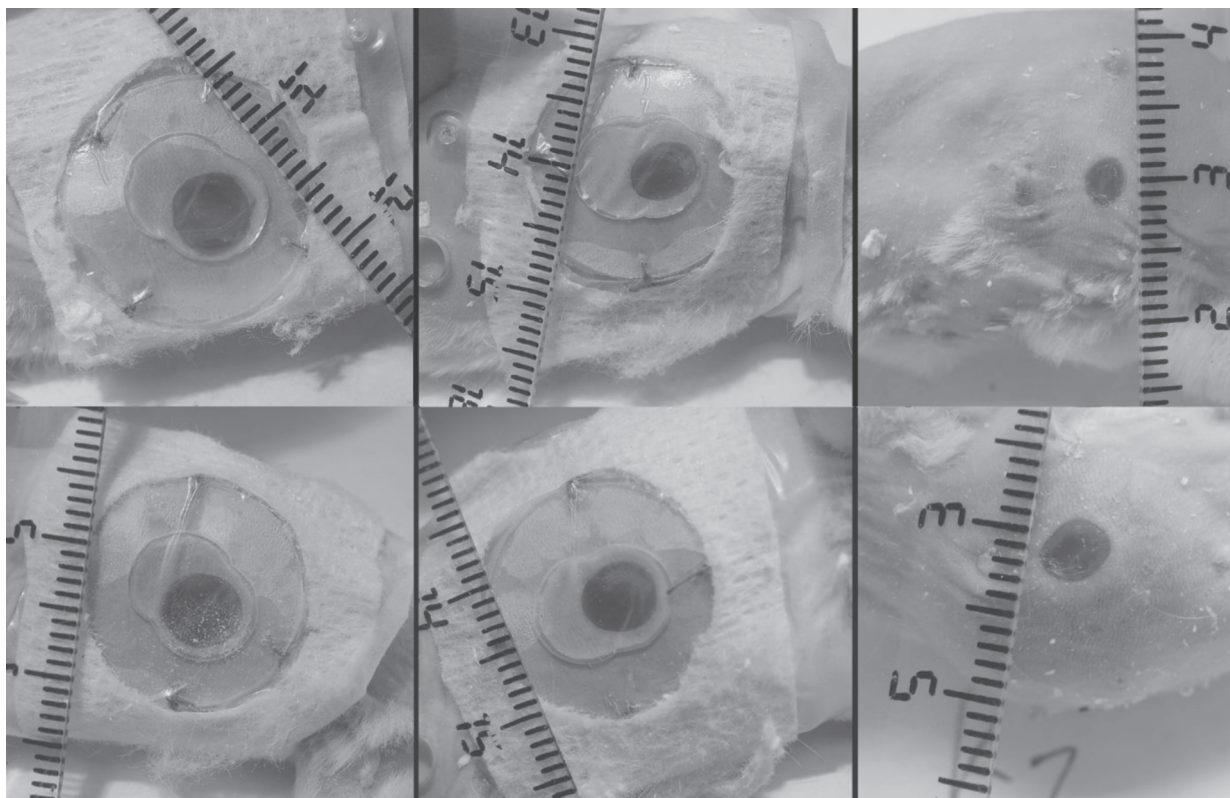


Рис. 1. Динамика ранозаживления у мышей. Сверху – фотографии животных, в раны которых вносили рекомбинантный БТШ90β, снизу – контрольные животные. Слева направо: 4, 8 и 12-е сут.

Photoshop CS 6.0). Площадь раны, полученную в пикселях, использовали для проведения расчетов (использовали не менее трех фотографий).

Скорости ранозаживления у экспериментальных и контрольных животных определяли путем сравнения площади раневой поверхности на 4, 8 и 12-е сут после ранения. Для этого животных усыпляли и делали снимки каждой раны фотоаппаратом Олимпус с-4000 (Япония); типичные фотографии представлены на рис. 1. Снимки обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS6. Полученные значения площади раневой поверхности использовали для последующего статистического анализа с применением критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика БТШ90β. В работе использовался рекомбинантный БТШ90β. Выбор в пользу рекомбинантного препарата был обусловлен экономическими соображениями. Чистота очищенного рекомбинантного белка была оценена с помощью ДСН-ПААГ и составляла не менее 90% (рис. 2).

С использованием иммуноферментного анализа было установлено, что препарат рекомбинантного БТШ90β специфически связывается с

антителами к БТШ90β и БТШ90α/БТШ90β, но не связывается с антителами к БТШ90α (табл. 1). Для определения сохранения у препарата рекомбинантного БТШ90β свойств нативного белка оценивали стимуляцию миграции и инвазии клеток фибросаркомы человека HT1080 *in vitro*. В результате было установлено, что препарат рекомбинантного БТШ90β в концентрации 50 мкг/мл стимулировал процессы миграции и инвазии на 21 ± 7 и $46 \pm 11\%$ соответственно (рис. 3), что свидетельствует о сохранении свойств нативного белка у рекомбинантного БТШ90β. Нативный БТШ90 из мозга быка, представляющий собой смесь БТШ90α и БТШ90β, стимулировал миграцию и инвазию клеток эффективнее, чем рекомбинантный БТШ90β (табл. 1).

Анализ влияния БТШ90 на скорость регенерации шинированной раны у мышей. В результате проведенных на животных экспериментов было обнаружено, что внесение в раневую область препарата рекомбинантного БТШ90β оказывает положительное влияние на скорость ранозаживления у опытных животных (рис. 1). На 12-е сут среднее увеличение скорости ранозаживления при внесении в раневую поверхность БТШ90β составило 28% ($p \leq 0.05$) (рис. 4). Сравнивая эти данные с данными, полученными в эксперимен-

тах по миграции и инвазии, можно отметить, что скорости ранозаживления и миграции клеток примерно равны. Как отмечено выше, ранозаживление в нашей модели обуславливается процессами миграции и инвазии. Ввиду того что в модели шинированной раны миграция кератиноцитов и фибробластов проходит по поверхности выстилающих раны клеток, влияние ВКМ на эту миграцию минимально. В связи с этим более выраженная у БТШ90 β активация инвазии в нашей модели не оказывает существенного влияния на скорость сдвига фронта раны, а ранозаживляющий эффект от применения БТШ90 β не слишком выражен.

Ранее в работе на мышах (Cheng *et al.*, 2011) было показано, что применение препарата рекомбинантного БТШ90 α приводит к значительному (до 90%) ускорению процессов ранозаживления у мышей. В настоящий момент нет данных по влиянию БТШ90 β на ранозаживление у этих животных, однако по результатам исследований, проведенных на свиньях (Jayaprakash *et al.*, 2015), было показано, что однократное внесение в рану препарата БТШ90 α приводит к двукратному увеличению скорости ранозаживления по сравнению с вариантом, где в рану вносили БТШ90 β . При этом, сравнивая результаты наших экспериментов (с применением БТШ90 β) с данными Ченга с соавт. (Cheng *et al.*, 2011) (исследовали БТШ90 α), можно отметить, что в наших экспериментах скорость ранозаживления оказалась более чем в 3 раза ниже. Такая выраженная разница может быть обусловлена двумя причинами. Значительную роль в различии влияния БТШ90 β на скорость ранозаживления могут играть видовые особенности физиологии экспериментальных животных. В частности, свиньи имеют кожный покров, прочно связанный с жировой клетчаткой, в то время как у мышей кожа закреплена более подвижно, что может полностью менять как трофику раневой области, так и сами механизмы ранозаживления. Второй причиной могла быть выбранная экспериментальная модель. В работе Ченга с соавт. не использовали шину, поэтому края раны оставались свободными (Cheng *et al.*, 2011). В этом случае на скорость застывания раны начинала значительно влиять раневая контракция. Можно предположить, что внесение препарата БТШ90 β влияет не только на процессы клеточной миграции (а следовательно, и ассоциированного с ними ранозаживления), но и на процессы контракции.

Однако при проведении исследования в этой области стоит обратить внимание на выраженную зависимость получаемых в экспериментах результатов от используемых модельных животных. При этом даже в экспериментах, проводимых на одном и том же виде животного, но с применением различных моделей ранозаживления могут наблюдаться значительные расхождения результатов, что

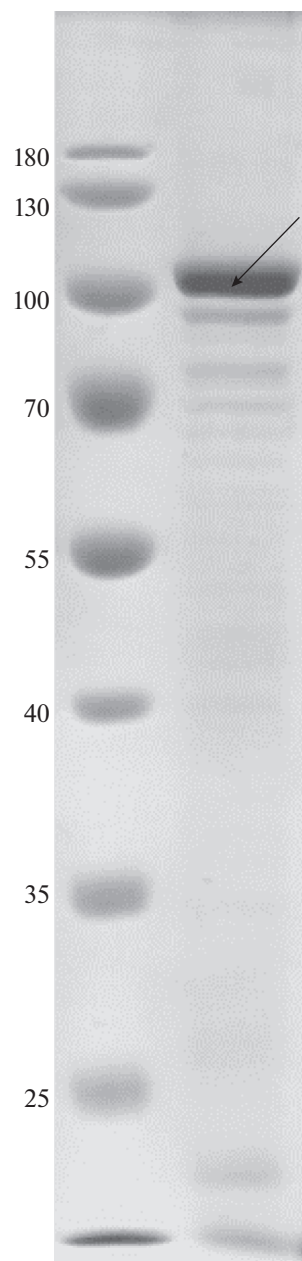


Рис. 2. ДСН-ПААГ-электрофорез очищенного препарата БТШ90 β (отмечен стрелкой). Левый трек – маркер молекулярных масс (в кДа).

не позволяет прямо экстраполировать эти результаты на человека. Дальнейшие исследования позволят подобрать комбинации БТШ90 β и БТШ90 α для различных условий ран (внутренние послеоперационные, поверхностные), способные значительно ускорить процессы ранозаживления, не вызывая при этом негативных последствий.

Таким образом, применение БТШ90 β может быть весьма перспективным при лечении хронических ран. Исследования, проведенные в данной работе, позволят расширить представление о

Таблица 1. Анализ иммунологического соответствия и активирующего воздействия на клетки рекомбинантного БТШ90β

Тип БТШ90	Реактивность с антителами в ИФА*			
	Специфичность антител			
	БТШ90α	БТШ90β	БТШ90α/β	негативный контроль
Рекомбинантный БТШ90β человека	—	+++	++++	—
Нативный БТШ90 быка (смесь БТШ90α и БТШ90β)	+++	++	++++	—

Примечание. * – реактивность антител с БТШ90 оценивали по интенсивности реакции антител с антигенами в ИФА (++++, +++, ++); “—” – реакция отсутствует.

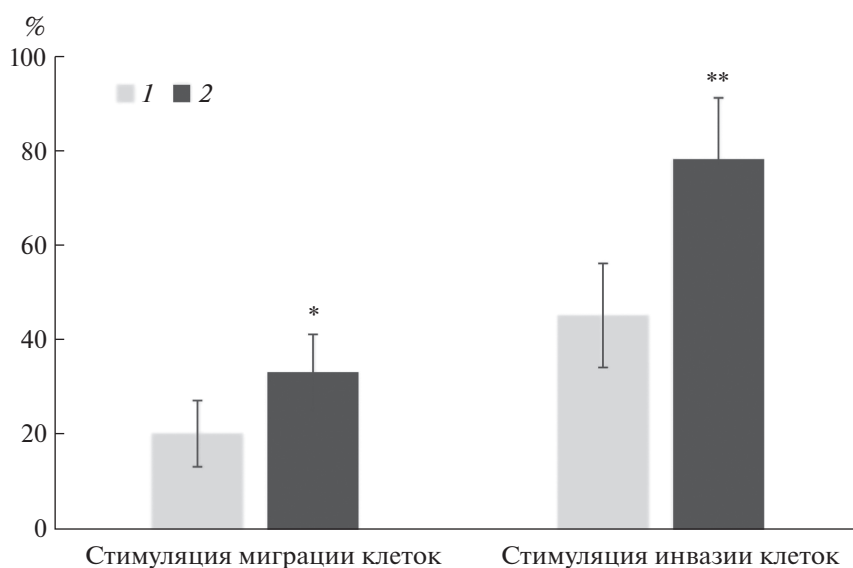


Рис. 3. Сравнение скорости миграции и инвазии клеток HT1080 *in vitro* в присутствии рекомбинантного БТШ90β человека и нативного БТШ90 быка. Стимулирующее влияние оценено относительно контрольных нестимулированных клеток и выражено в процентах, контроль принят за 0%. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Данные представлены относительно контроля в виде среднего арифметического с разбросом в виде стандартного отклонения. * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$. 1 – рекомбинантный БТШ90β человека, 2 – нативный БТШ90 быка (смесь БТШ90α и β).

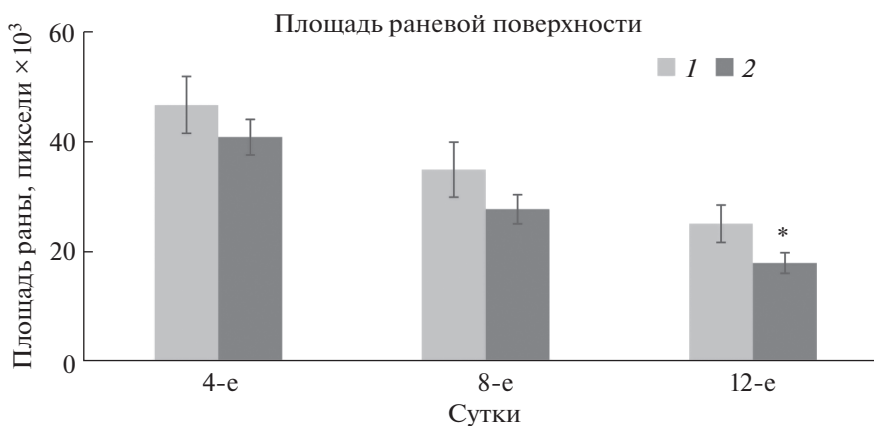


Рис. 4. Площадь раневой поверхности у животных на 4, 8 и 12-е сут эксперимента. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Результаты представлены в виде среднего арифметического с разбросом в виде стандартного отклонения. * – $p \leq 0.05$. 1 – контроль, 2 – опыт.

подходах к заживлению ран в таких областях, как травматология, хирургия, а также трансплантология.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bandyopadhyay B., Fan J., Guan S., Li Y., Chen M., Woodley D.T., Li W.* A “traffic control” role for TGF-beta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing // *J. Cell Biol.* 2006. V. 172. № 7. P. 1093–1105.
- Bhatia A., O'Brien K., Chen M., Wong A., Garner W., Woodley D.T., Li W.* Dual therapeutic functions of F-5 fragment in burn wounds: preventing wound progression and promoting wound healing in pigs // *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 2016. V. 3. P. 16041.
- Bozzuto G., Ruggieri P., Molinari A.* Molecular aspects of tumor cell migration and invasion // *Ann. Ist. Super Sanita.* 2010. V. 46. № 1. P. 66–80.
- Burger D., Dayer J.M.* Assays of T-cell contact dependent monocyte-macrophage functions // *Meth. Mol. Med.* 2007. V. 136. P. 139–148.
- Cheng C.F., Fan J., Fedesco M., Guan S., Li Y., Bandyopadhyay B., Bright A.M., Yerushalmi D., Liang M., Chen M., Han Y.P., Woodley D.T., Li W.* Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. № 10. P. 3344–3358.
- Cheng C.F., Sahu D., Tsen F., Zhao Z., Fan J., Kim R., Wang X., O'Brien K., Li Y., Kuang Y., Chen M., Woodley D.T., Li W.* A fragment of secreted Hsp90alpha carries properties that enable it to accelerate effectively both acute and diabetic wound healing in mice // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 11. P. 4348–4361.
- Clayton A., Turkes A., Navabi H., Mason M.D., Tabi Z.* Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 3631–3638.
- Condeelis J., Singer R., Segall J.E.* The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 695–718.
- Crandall M.A.* Wound care markets: volume 1: skin ulcers // *Wound Care Markets / Ed. Heffner S. N.Y.: Kalorama Inform., 2003. P. 103–118.*
- Dong H., Zou M., Bhatia A., Jayaprakash P., Hofman F., Ying Q., Chen M., Woodley D.T., Li W.* Breast cancer MDA-MB-231 cells use secreted heat shock protein-90alpha (Hsp90alpha) to survive a hostile hypoxic environment // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20605.
- Gopal U., Bohonowych J.E., Lema-Tome C., Liu A., Garrett-Mayer E., Wang B., Isaacs J.S.* A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 3. e17649.
- Hom D.B., Maisel R.H.* Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1992. V. 101. № 4. P. 349–354.
- Jayaprakash P., Dong H., Zou M., Bhatia A., O'Brien K., Chen M., Woodley D.T., Li W.* Hsp90alpha and Hsp90beta together operate a hypoxia and nutrient paucity stress-response mechanism during wound healing // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 8. P. 1475–1480.
- Lauffenburger D.A., Horwitz A.F.* Cell migration: a physically integrated molecular process // *Cell.* 1996. V. 84. № 3. P. 359–369.
- LeGrand E.K.* Preclinical promise of becaplermin (rhPDGF-BB) in wound healing // *Am. J. Surg.* 1998. V. 176. № 2a Suppl. P. 48S–54S.
- Lei H., Venkatakrisnan A., Yu S., Kazlauskas A.* Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 13. P. 9364–9371.
- Levine M.D., Liotta L.A., Stracke M.L.* Stimulation and regulation of tumor cell motility in invasion and metastasis // *EXS.* 1995. V. 74. P. 157–79.
- Li W., Li Y., Guan S., Fan J., Cheng C.F., Bright A.M., Chinn C., Chen M., Woodley D.T.* Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 5. P. 1221–1233.
- Li W., Sahu D., Tsen F.* Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer // *Bioch. Bioph. Acta – Mol. Cell Res.* 2012. V. 1823. № 3. P. 730–741.
- Liao D.F., Jin Z.G., Baas A.S., Daum G., Gygi S.P., Aebersold R., Berk B.C.* Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 1. P. 189–196.
- Lv L.H., Wan Y.L., Lin Y., Zhang W., Yang M., Li G.L., Lin H.M., Shang C.Z., Chen Y.J., Min J.* Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses *in vitro* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 19. P. 15874–15885.
- Martin P.* Wound healing – aiming for perfect skin regeneration // *Science.* 1997. V. 276. № 5309. P. 75–81.
- O'Brien K., Bhatia A., Tsen F., Chen M., Wong A.K., Woodley D.T., Li W.* Identification of the critical therapeutic entity in secreted Hsp90a that promotes wound healing in newly restandardized healthy and diabetic pig models // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. P. e113956.
- Orgill D., Blanco C.* Biomaterials for treating skin loss // *Woodhead Publishing.* 2009. p. 256.
- Price J.T., Bonovich M.T., Kohn E.C.* The biochemistry of cancer dissemination // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 32. № 3. P. 175–253.
- Ramteke A., Ting H., Agarwal C., Mateen S., Somasagara R., Hussain A., Graner M., Frederick B., Agarwal R., Deep G.* Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules // *Mol. Carcinog.* 2013. V. 54. № 7. P. 554–565.
- Sahai E.* Mechanisms of cancer cell invasion // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. № 1. P. 87–96.
- Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C.* Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy // *J. Leukoc. Biol.* 2007. V. 81. № 1. P. 15–27.
- Sen C.K., Gordillo G.M., Roy S., Kirsner R., Lambert L., Hunt T.K., Gottrup F., Gurtner G.C., Longaker M.T.* Hu-

- man skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy // *Wound Repair Regen.* 2009. V. 17. № 6. P. 763–771.
- Sidera K., Patsavoudi E.* Extracellular HSP90: an emerging target for cancer therapy // *Current Signal. Transduction Therapy.* 2009. V. 4. № 1. P. 51–58.
- Singh N., Armstrong D.G., Lipsky B.A.* Preventing foot ulcers in patients with diabetes // *JAMA.* 2005. V. 293. № 2. P. 217–228.
- Skarga Y., Vrublevskaya V., Evdokimovskaya Y., Morenkov O.* Purification of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and simultaneous purification of hsp70/hsc70, hsp90 and hsp96 from mammalian tissues and cells using thiophilic interaction chromatography // *Biomed. Chromatogr.* 2009. V. 23. № 11. P. 1208–1216.
- Snigireva A.V., Vrublevskaya V.V., Afanasyev V.N., Morenkov O.S.* Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the binding of Hsp90 α and Hsp90 β to the cell plasma membrane // *Cell Adh. Migr.* 2015. V. 9. № 6. P. 460–468.
- Song X., Luo Y.* The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion from endothelial cells and its role in angiogenesis during wound healing // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2010. V. 398. № 1. P. 111–117.
- Song X., Wang X., Zhuo W., Shi H., Feng D., Sun Y., Liang Y., Fu Y., Zhou D., Luo Y.* The regulatory mechanism of extracellular Hsp90 on matrix metalloproteinase-2 processing and tumor angiogenesis // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 51. P. 40039–40049.
- Sordat B., Piffaretti J.-C., Weiss L.* Is there a common definition for invasiveness? // *J. Invasion Metastasis.* 1990. V. 10. № 3. P. 178–192.
- Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A., Kleiner D.E. Jr.* Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis // *FASEB J.* 1993. V. 7. № 15. P. 1434–1441.
- Sullivan T.P., Eaglstein W.H., Davis S.C., Mertz P.* The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* // 2001. V. 9. № 2. P. 66–76.
- Tsutsumi S., Neckers L.* Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis // *Cancer Sci.* 2007. V. 98. № 10. P. 1536–1539.
- Wang X., Ge J., Tredget E.E., Wu Y.* The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 2. P. 302–309.
- Wang X., Song X., Zhuo W., Fu Y., Shi H., Liang Y., Tong M., Chang G., Luo Y.* The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 50. P. 21288–21293.
- Woodley D.T., Fan J., Cheng C.F., Li Y., Chen M., Bu G., Li W.* Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90 α autocrine signaling to promote keratinocyte migration // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. P. 1495–1498.
- Woodley D.T., Wysong A., DeClerck B., Chen M., Li W.* Keratinocyte migration and a hypothetical new role for extracellular heat shock protein 90 Alpha in orchestrating skin wound healing // *Adv. Wound Care (New Rochelle).* 2015. V. 4. № 4. P. 203–212.
- Yamaguchi H., Wyckoff J., Condeelis J.* Cell migration in tumors // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. V. 17. № 5. P. 559–564.
- Yang Y., Rao R., Shen J., Tang Y., Fiskus W., Nechtman J., Atadja P., Bhalla K.* Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90 α in tumor cell invasion // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 12. P. 4833–4842.
- Yu X., Harris S.L., Levine A.J.* The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 9. P. 4795–4801.

Influence of Recombinant Heat Shock Protein 90 β (Hsp90 β) on the Speed of Wound Healing in Mice

V. K. Zhalimov^{1, #}, Y. Y. Skarga¹, Yu. V. Gritsyna², and O. S. Morenkov¹

¹*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya, 3, Pushchino, Moscow obl., 142290 Russia*

²*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya, 3, Pushchino, Moscow obl., 142290 Russia*

#e-mail: vitaly.zhalimov@gmail.com

It is known that alpha isoform of heat shock protein 90 (HSP90 α) plays an important role in wound healing. HSP90 α has stimulating effect on migration and invasion of cells in the wound area. The role of beta isoforms of HSP90 (HSP90 β) in the process of wound healing is not fully defined. In this work recombinant human HSP90 β was obtained and characterized, expressed in *E. coli*. Using an excision model of wound healing it was found the following fact: purified recombinant human HSP90 β introduced into the wound the region leads to increase the rate of wound healing by 28% compared to control in mice. This allows consider HSP90 β as a promising drug for wound healing.