

# EFFETS DE LA MODULATION CONTINUE SUR LA RÉPONSE DES FIBROBLASTES HUMAINS STIMULÉS IN VITRO PAR LA RADIOFRÉQUENCE SUBTHERMIQUE

Trillo MA, Martínez MA, Úbeda A. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2020:1-9.

(Résumé autorisé. Article original sur Open access : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15368378.2020.1830796>)

## INTRODUCTION

La stimulation par radiofréquence a fait ses preuves dans la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus<sup>(1, 2)</sup>. Le transfert d'énergie capacitive/résistive (CRET) est une thérapie basée sur l'application non-invasive d'une radiofréquence comprise entre 448 et 600 kHz, dont le but est de créer une hyperthermie dans les tissus<sup>(3-5)</sup>. Les thérapies CRET se sont avérées efficaces dans le traitement des os<sup>(6)</sup>, des muscles<sup>(7, 8)</sup> ou des tendons et ligaments<sup>(9, 10)</sup>.

L'exposition in vitro au CRET de 448 kHz, appliqué à une puissance subthermique, favorise la prolifération des cellules souches adipeuses humaines<sup>(11)</sup> ainsi que la différenciation des chondrocytes<sup>(12)</sup>. La réponse cellulaire au CRET est non-linéaire et dépend de la fréquence du signal<sup>(13)</sup>. La modulation du signal émis s'est avérée pertinente, concernant aussi bien les effets biologiques provoqués par les champs électromagnétiques de la radiofréquence<sup>(14, 15)</sup> que les effets biologiques générés par les radiofréquences, telles que celles des bistouris électriques utilisés pour inciser et non coaguler<sup>(16)</sup>. Ainsi, il est possible que la modulation du signal de radiofréquence influence considérablement la réponse cellulaire du CRET.

Le présent document s'intéresse à la réponse in vitro des fibroblastes humains exposés au CRET de 448 kHz, à une puissance subthermique, et compare les effets d'une onde non modulée avec ceux d'un signal dont la fréquence à 448 kHz est modulé en amplitude à une amplitude de 20 kHz. Les réponses cellulaires étudiées étaient liées au rôle potentiel de l'expression de la décorine et des protéines de choc thermique (HSP) Hsp47 et Hsp27, impliquées dans la régénération cutanée<sup>(17, 18)</sup>. Le fibroblaste Hsp47 est un chaperon spécifique de la synthèse et la libération du collagène<sup>(19)</sup> et l'un des plus pertinents dans la réparation des tissus<sup>(20, 21)</sup>. Dans les tissus sous-cutanés, la libération de Hsp47 coïncide avec la prolifération des cellules et l'augmentation de la synthèse du collagène de type I<sup>(22)</sup>. Le Hsp27 appartient à la famille des petites protéines qui assurent la stabilité des microfilaments d'actine<sup>(23)</sup> et empêchent l'apoptose induite par le stress<sup>(24)</sup>. La phosphorylation de la Hsp27 augmente sur le pourtour de la plaie pendant la phase de cicatrisation<sup>(25)</sup> et la contraction de la plaie est favorisée par la surexpression du Hsp27 dans les fibroblastes, tandis qu'elle est compromise lorsque les fibroblastes présentent de faibles niveaux de la protéine<sup>(26)</sup>. Concernant la décorine (DCN), elle constitue 30 à 40 % de l'ensemble des protéoglycanes

de la peau<sup>(27)</sup> et joue un rôle prédominant dans l'homéostasie de la peau<sup>(28)</sup>.

Ces résultats confirment les indications antérieures selon lesquelles la réponse cellulaire au CRET dépend de la fréquence et de la modulation. Bien que ces résultats montrent que les signaux testés augmentent considérablement et de manière similaire l'expression précoce (4 heures) du Hsp47, l'expression précoce du Hsp27 et l'expression tardive (20 heures) de la décorine n'ont connu une augmentation significative qu'avec le signal modulé. Quant à la prolifération des fibroblastes, elle a été considérablement accrue par les deux signaux, le signal modulé démontrant une plus grande efficacité. Les résultats laissent penser que les effets de la thérapie CRET sur la régénération des tissus pourraient être influencés en partie par les changements électro-induits de l'expression du HSP dans les fibroblastes, potentiellement capables de favoriser la survie cellulaire et la cicatrisation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Culture cellulaire

Les fibroblastes dermiques humains primaires ont été repiqués une fois par semaine, puis des boîtes de Petri ont étéensemencées avec une densité de 5 500 cellules/cm<sup>2</sup>. Au total, 8 boîtes de Petri ont été utilisées pour chaque cycle expérimental.

### Exposition au CRET

L'exposition au CRET a suivi le protocole décrit par ailleurs<sup>(11)</sup>. Le schéma de stimulation comprenait des impulsions radiofréquence de 5 minutes à une puissance subthermique de 100 µA/mm<sup>2</sup>, espacées de 4 heures, pour une période totale de 4 heures et 10 minutes, 24 heures ou 48 heures, en fonction de l'expérience. Deux signaux ont été testés : un signal non modulé de 448 kHz qui régulerait la prolifération et la différenciation des cellules souches humaines<sup>(11, 12, 29)</sup> et un signal de 448 kHz avec une modulation de 20 kHz, d'une amplitude de 40 %. Quatre jours après la mise en culture sur boîte de Petri, des paires d'électrodes ont été placées dans les huit boîtes de Petri et connectées en série à un générateur de signal (INDIBA, S.A. Barcelone, Espagne). Seules les électrodes placées dans les quatre boîtes correspondant aux échantillons exposés à la radiofréquence ont été mises sous tension, les échantillons des quatre autres boîtes étant considérés comme échantillons témoins non exposés à une fréquence réelle.

## Viabilité et prolifération cellulaires

Les cellules ont été prélevées au terme de la période de 48 heures d'exposition réelle ou fictive à la radiofréquence et leur viabilité a été quantifiée grâce à la méthode d'exclusion au bleu de trypan. Cinq échantillons ont été testés pour chaque signal. La prolifération cellulaire après 24 heures ou 48 heures d'exposition réelle ou fictive à la radiofréquence a été testée en quantifiant l'expression de la protéine PCNA à l'aide de la méthode western blot.

## Immunofluorescence

Les niveaux d'expression de la PCNA, des Hsp47 et Hsp27, et du protéoglycane décorine ont été évalués selon la méthode d'immunotransfert décrite par ailleurs (30). Dix-neuf répétitions expérimentales ont été réalisées pour la protéine PCNA, onze répétitions pour la Hsp47, huit répétitions pour la Hsp27 et douze répétitions pour l'analyse de la décorine. Huit échantillons (4 exposés au CRET et 4 exposés à un traitement fictif) ont été analysés pour chaque répétition et chaque signal.

## Analyse statistique

Toutes les procédures et analyses expérimentales ont été réalisées à l'aveugle dans le cadre de ce traitement. Les données ont été normalisées et exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de mesure (SEM). Les données des groupes traités et celles de leurs groupes témoins respectifs ont été comparées à l'aide du test-t et du logiciel GraphPad Prism. La signification statistique a été fixée à  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### Effets du CRET sur la prolifération cellulaire

#### Nombre de cellules

Le traitement sur 48 heures avec les deux signaux CRET a conduit à une augmentation significative du nombre de cellules (figure 1). Le signal non modulé a engendré une augmentation importante de 10,5 % en moyenne par rapport au groupe témoin ( $p < 0,01$ ), tandis que la modulation a conduit à une augmentation de 20,2 % par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ), ainsi qu'une hausse importante du nombre de cellules par rapport à celui obtenu en réponse au signal non modulé ( $p < 0,05$ ).

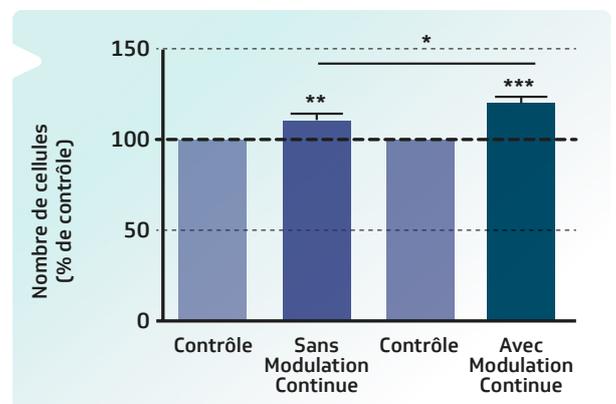
#### Expression de la protéine PCNA

Les deux signaux CRET ont favorisé l'expression de la PCNA (figure 2), la réponse à la modulation apparaissant plus tôt (à 24 heures) que la réponse au signal non modulé (à 48 heures), ce qui concorde avec l'augmentation du nombre de cellules décrite ci-dessus, après 48 heures d'exposition au CRET.

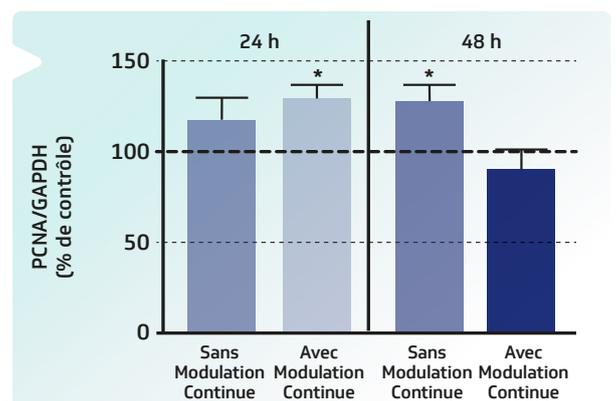
### Effets du CRET sur l'expression des protéines Hsp47, Hsp27 et décorine

Bien que le test par immunotransfert à 4 heures et 10 minutes ait montré que la Hsp47 s'exprimait de façon constitutive à la fois dans les cultures témoins et les cultures exposées au CRET, l'analyse des données a révélé que par rapport aux groupes témoins, le niveau d'expression de la protéine connaissait une augmentation importante similaire dans les échantillons

exposés à l'un des deux signaux CRET (figure 3a). La protéine Hsp27 s'exprimait également de façon constitutive dans les cultures témoins (figure 3b) et son expression était plus élevée dans les échantillons exposés au CRET, même si la différence par rapport au groupe témoins était flagrante uniquement dans le groupe exposé au signal modulé. Une augmentation générale de l'immunomarquage Hsp47 présent dans le cytoplasme des échantillons exposés au CRET a aussi été observée, ainsi qu'un marquage Hsp47 plus dense dans les échantillons stimulés par la modulation. Concernant la décorine, il a été noté qu'après 24 heures de traitement, la protéine centrale (protéine core de la décorine ; 50 kDa) présentait une importante surexpression quand exposée à la modulation. Le signal non modulé ne provoquait cependant aucun effet. Pour ce qui est de la protéine mature (DCN-GAG) de 100 kDa, aucun des deux signaux n'a modifié son expression de manière significative par rapport aux cultures témoins.



**Figure 1.** Réponse proliférative à la stimulation par CRET. Quantification des cellules à l'aide du bleu de trypan dans les échantillons exposés de façon intermittente (exposition de 5 minutes/non exposition de 4 heures) ou exposés à un traitement fictif pendant 48 heures. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de mesure (SEM) des cinq répétitions indépendantes. Les données sont normalisées en prenant en compte les groupes témoins respectifs (ligne en pointillés 100 %). \* :  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\* :  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ; test-t.



**Figure 2.** Expression de la protéine PCNA avec la méthode western blot. Les données sont normalisées en prenant en compte les groupes témoins correspondants et sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de mesure (SEM) des neuf répétitions indépendantes avec le signal non modulé (N=4 à 24 h et N=5 à 48 h) et des dix répétitions avec la modulation (N=5 à 24 h et N=5 à 48 h). \* :  $0,01 \leq p < 0,05$ , test-t.

## DISCUSSION

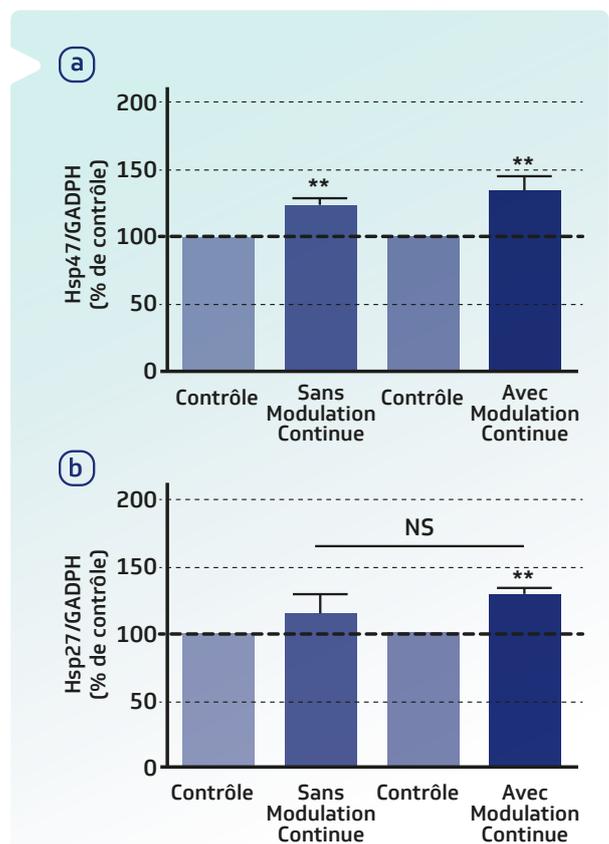
Ces résultats montrent que la stimulation subthermique par CRET augmente considérablement la prolifération des fibroblastes épidermiques néonataux et qu'une exposition de 48 h au signal modulé

induit une hausse bien plus importante du nombre de cellules qu'avec le signal non modulé (figure 1). L'expression de la PCNA s'est aussi accrue sensiblement en réponse aux deux signaux CRET, mais l'effet de la modulation a été visible 24 heures avant celui du signal non modulé (figure 2), indiquant que la modulation pourrait accroître la réponse au signal. Les niveaux de PCNA plus élevés indiquent que la réponse proliférative est susceptible d'être favorisée par la stimulation CRET du cycle de division cellulaire, comme on le constate pour les cellules souches adipeuses humaines exposées au signal non modulé<sup>(11)</sup>. Il se pourrait donc que la promotion des cellules souches et la prolifération des fibroblastes électro-induites contribuent aux effets bénéfiques sur la réparation et la régénération des tissus attribués au CRET. Concernant la protéine HSP comme marqueur moléculaire potentiel de la réponse au CRET, nous nous sommes concentrés sur les protéines Hsp27 et Hsp47 en raison de leur pertinence dans la régénération cutanée. La protéine Hsp47 est associée au niveau fonctionnel à la maturation du collagène et elle constitue, avec la protéine Hsp27, les protéines centrales de l'homéostasie et la fonction de la peau<sup>(31)</sup>. La protéine Hsp27 contrôle les fonctions cellulaires liées au remodelage du cytosquelette d'actine dans différents types de cellules<sup>(32-34)</sup>. Dans les fibroblastes, la Hsp27 corégule l'adhésion des cellules, la motilité et la contraction de la matrice extracellulaire<sup>(26)</sup>. Par ailleurs, la stabilisation des microfilaments d'actine et leur rétablissement accéléré après leur rupture font partie des principales fonctions protectrices et antioxydantes de la protéine Hsp27 contre le stress, qu'il soit thermique ou autre<sup>(35-37)</sup>.

Les résultats montrent que les deux signaux CRET augmentent considérablement l'expression de la protéine Hsp47 (figure 3). Parmi les protéines du stress du réticulum endoplasmique, seule la Hsp47 est produite par le choc induit par la chaleur<sup>(20)</sup>. Dans cette étude, la surexpression de la Hsp47 provoquée par le stimulus subthermique est vraisemblablement régulé par des éléments régulateurs promoteurs spécifiques qui jouent un rôle clé dans la régénération des cellules et des tissus<sup>(38)</sup>. Cela serait cohérent avec les effets collagénogéniques observés dans les cellules souches humaines sous l'effet du CRET<sup>(12)</sup>.

Concernant la Hsp27, aussi bien sa phosphorylation (32,9 % ± 12,8 % par rapport aux témoins ; p < 0,05) que son expression ont augmenté considérablement après une exposition à court terme au signal modulé CRET (figure 3). Les échantillons exposés au signal non modulé ont également présenté une surexpression de la Hsp27 par rapport aux cultures témoins, mais pas de manière significative. On peut donc imaginer que, comme la Hsp47, la Hsp27 est sensible aux deux signaux CRET, le signal modulé ayant une plus grande efficacité sur la surexpression précoce de cette protéine.

Les résultats montrent que la modulation est aussi pertinente dans l'expression de la décorine



**Figure 3.** Analyse par western blot de l'expression des protéines Hsp47 et Hsp27 après un traitement de 4 heures et 10 minutes. Les données reflètent les moyennes ± l'erreur standard de mesure (SEM) des 5 ou 6 répétitions du groupe expérimental, normalisées en prenant en compte les cultures témoins respectives ; (a) expression de la protéine Hsp47, (b) expression de la protéine Hsp27.

(DCN), cette petite protéoglycane riche en leucine, induite par le CRET. Après avoir été synthétisée, la protéine centrale de la décorine, la protéine core, se lie à une chaîne GAG pour former une molécule de décorine mature<sup>(39)</sup>. Ces résultats montrent qu'une stimulation de 24 heures avec le signal modulé induit une surexpression importante de la protéine core de la décorine, mais pas de la protéine mature. Ceci s'explique probablement par le fait que le stimulus a été appliqué avant la formation de la protéine mature. Il a été rapporté que la Hsp47 présente dans le réticulum endoplasmique se lie à la décorine avec une affinité comparable à celle observée entre la Hsp47 et le collagène de type I et que le manque de Hsp47 inhibe aussi bien la sécrétion de collagène que la sécrétion de deux petites protéoglycanes riches en leucine, la lumican et la décorine<sup>(40)</sup>. Cette supposition, selon laquelle la Hsp47 joue non seulement un rôle dans le pliage et la sécrétion du collagène<sup>(41-43)</sup>, mais intervient aussi dans la sécrétion de la petite protéoglycane riche en leucine, contribue à une meilleure compréhension des interactions moléculaires coordonnées qui contrôlent l'organisation de la matrice du collagène fonctionnel. Nous ne savons pas si la surexpression de la décorine induite après 24 heures d'exposition au signal modulé est attribuable à la précédente surexpression de la Hsp47 (à 4 heures et 10 minutes). Toutefois, la décorine exerce des fonctions d'alignement, de stabilisation et de régulation du diamètre des fibres de collagène et agit comme médiateur entre différents types de

collagène. Puisqu'elle agit aussi comme médiateur de signal pour les récepteurs de la membrane, tels que le récepteur du facteur de croissance épidermique, la décorine est considérée comme un biomarqueur pertinent dans les processus impliqués dans le vieillissement de la peau ou la cicatrisation et la régénération<sup>(44, 45)</sup>. Dans ce contexte, les résultats présentés ici laissent penser que la Hsp47, la Hsp27 et la décorine pourraient faire partie d'un groupe de biomarqueurs dont la surexpression dans les fibroblastes induite électriquement pourrait intervenir dans les processus de migration cellulaire, la contraction de la matrice extracellulaire, la collagénogénèse et la fibrillogénèse, essentiels à la réparation des tissus dans le cadre des thérapies CRET. Pour résumer, les résultats de cette étude révèlent que la thérapie CRET subthermique est efficace pour promouvoir la prolifération des fibroblastes, le signal modulé étant plus efficace que le signal non modulé dans le déclenchement de cette réponse. Par ailleurs, bien que les deux signaux induisent une surexpression du chaperon Hsp47 spécifique au collagène sur le court terme (4 heures et 10 minutes), seul le signal modulé conduit à une activation et une surexpression significatives de la Hsp27 dans la même phase initiale, ainsi que la surexpression de la décorine 20 heures plus tard (24 heures après le début de l'exposition). Ainsi, la modulation de 20 kHz augmenterait l'efficacité du signal sinusoïdal de 448 kHz dans le déclenchement précoce de la réponse observée. Des travaux de recherche supplémentaires sont en cours pour déterminer si l'accélération des processus impliqués dans la régénération des tissus est un effet direct de la modulation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Conner-Kerr T, et al. Retrospective analysis of pulsed radiofrequency energy therapy use in the treatment of chronic pressure ulcers. *Advances in skin & wound care*. 2012;25(6):253-60.
- Rawe IM, et al. The use of a portable, wearable form of pulsed radio frequency electromagnetic energy device for the healing of recalcitrant ulcers: a case report. *Int Wound J*. 2012;9(3):253-8.
- Fousekis K, et al. Posterior thigh thermal skin adaptations to radiofrequency treatment at 448 kHz applied with or without Indiba® fascia treatment tools. *J Phys Ther Sci*. 2020;32(4):292-6.
- Kotnik T, et al. Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields. *Bioelectromagnetics*. 2000;21(5):385-94.
- Lopez-de-Celis C, et al. Thermal and non-thermal effects of capacitive-resistive electric transfer application on the Achilles tendon and musculotendinous junction of the gastrocnemius muscle: a cadaveric study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2020;21(1):46.
- Kumaran B, et al. Treatment using 448kHz capacitive resistive monopolar radiofrequency improves pain and function in patients with osteoarthritis of the knee joint: a randomised controlled trial. *Physiotherapy*. 2019;105(1):98-107.
- Ganzit GP, et al. Nuove metodiche nel trattamento della patologia musculo-articolare dell'atleta: la Tecarterapia. *Medicina dello Sport*. 2000;53(4):361-7.
- Yokota Y, et al. Effect of Capacitive and Resistive electric transfer on changes in muscle flexibility and lumbopelvic alignment after fatiguing exercise. *J Phys Ther Sci*. 2018;30(5):719-25.
- Bito T, et al. Acute Effects of Capacitive and Resistive electric transfer on the Achilles tendon. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2019.
- Stasinopoulos D, et al. 448 khz Capacitive Resistive Monopolar Radiofrequency in Patients with Rotator Cuff Tendinopathy. *A Pilot Study*. *Acta Scientific Orthopaedics*. 2020;3(4).
- Hernández-Bule ML, et al. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(5):1741-55.
- Hernández-Bule ML, et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells by radiofrequency electric stimulation. *J of Stem Cell Research & Therapy*. 2017;7(12):10.
- Hernández-Bule ML, et al. Response of neuroblastoma cells to RF currents as a function of the signal frequency. *BMC cancer*. 2019;19(1):889.
- Barbault A, et al. Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2009;28:51.
- Blackman CF. Treating cancer with amplitude-modulated electromagnetic fields: a potential paradigm shift, again? *British journal of cancer*. 2012;106(2):241-2.
- Karaki W, et al. Waveform Dependent Electrosurgical Effects on Soft Hydrated Tissues. *Journal of biomechanical engineering*. 2019;141(5):0510031-05100314.
- Millar NL, et al. Heat shock proteins in tendinopathy: novel molecular regulators. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:436203.
- Tukaj S, et al. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? *Cell stress & chaperones*. 2019;24(3):475-9.
- Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1998;16(7):379-86.
- Ito S, et al. Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J Biol Chem*. 2019;294(6):2133-41.
- Masago Y, et al. The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 5):1118-28.
- Wang ZL, et al. Collagen-binding heat shock protein HSP47 expression during healing of fetal skin wounds. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2002;31(2):179-84.
- Landry J, et al. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1995;73(9-10):703-7.
- Concannon CG, et al. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2003;8(1):61-70.
- Hirano S, et al. MAP kinase pathways involving hsp27 regulate fibroblast-mediated wound contraction. *J Surg Res*. 2002;102(2):77-84.
- Hirano S, et al. HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell stress & chaperones*. 2004;9(1):29-37.
- Li Y, et al. Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci Rep*. 2013;3:2422.
- Reed CC, et al. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(4-5):249-55.
- Hernández-Bule ML, et al. Antiadipogenic effects of subthermal electric stimulation at 448 kHz on differentiating human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):3895-903.
- Hernández-Bule ML, et al. Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins. *Int J Oncol*. 2010;37(6).
- Dams SD, et al. Pulsed heat shocks enhance procollagen type I and procollagen type III expression in human dermal fibroblasts. *Skin Res Technol*. 2010;16(3):354-64.
- Lutsch G, et al. Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin in rat and human heart. *Circulation*. 1997;96(10):3466-76.
- Neufer PD, et al. Differential expression of B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J Biol Chem*. 1996;271(39):24089-95.
- Bitar KN. HSP27 phosphorylation and interaction with actin-myosin in smooth muscle contraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(5):G894-903.
- Huot J, et al. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer research*. 1996;56(2):273-9.
- Lavoie JN, et al. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(1):505-16.
- Vidyasagar A, et al. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2012;5(1):7.
- Andersson R, et al. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature reviews Genetics*. 2020;21(2):71-87.
- Tiedemann K, et al. The glucuronyl C5-epimerase activity is the limiting factor in the dermatan sulfate biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;391(1):65-71.
- Ishikawa Y, et al. The endoplasmic reticulum-resident collagen chaperone Hsp47 interacts with and promotes the secretion of decorin, fibromodulin, and lumican. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(35):13707-16.
- Ishida Y, et al. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell*. 2006;17(5):2346-55.
- Ishikawa Y, et al. Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(41):E6036-e44.
- Nagai N, et al. Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol*. 2000;150(6):1499-506.
- Hill LJ, et al. Sustained release of decorin to the surface of the eye enables scarless corneal regeneration. *NPJ Regenerative medicine*. 2018;3:23.
- Pang X, et al. Small Leucine-Rich Proteoglycans in Skin Wound Healing. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:1649.