

Komórkowe i molekularne mechanizmy regeneracji i reorganizacji mięśni szkieletowych

Cellular and Molecular Mechanisms of Regeneration and Remodelling of Skeletal Muscles

Agnieszka Zembroń-Łacny^{1(A,B,D,E,G)}, Jarosław Krzywański^{2(A,B,D,E,F)},
Joanna Ostapiuk-Karolczuk^{1(A,B,D,E,F)}, Anna Kasperska^{1(A,B,D,E,F)}

¹ Zakład Medycyny Sportu i Biochemii, Zamiejscowy Wydział Kultury Fizycznej w Gorzowie Wlkp.,
Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu

² Centralny Ośrodek Medycyny Sportowej

¹ Department of Sports Medicine and Biochemistry, Faculty of Physical Culture Gorzow Wlkp.,
University School of Physical Education Poznan

² The National Centre of Sports Medicine

STRESZCZENIE

Proces odbudowy uszkodzonych mięśni szkieletowych obejmuje cztery fazy – degeneracji, odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, regeneracji oraz reorganizacji, regulowanych przez szereg cząsteczek wydzielanych przez komórki mięśniowe i obecne w tkance mięśniowej komórki immunologiczne, nabłonkowe, śródmiąższowe i in. Do tych cząsteczek należą cytokiny, czynniki wzrostu, erytropoetyna, enzymy oraz reaktywne formy tlenu i azotu (ang. *reactive oxygen and nitrogen species*, RONS). Jedne z nich silnie stymulują proliferację i wzrost komórek mięśniowych, inne mogą hamować. Od kilku lat cytokiny i czynniki wzrostu są stosowane w medycynie regeneracyjnej w formie koncentratu płytek krwi lub w formie preparatów rekombinowanych. Podejmowane są także próby wykorzystania komórek mięśniowych i hodowli linii komórkowych opartych na komórkach pochodzenia mięśniowego (ang. *muscle-derived stem cells*, MDSC) zawierających komórki satelitarne, mezoangioblasty i perycyty, wyizolowanych komórkach satelitarnych lub mioblastach.

Celem pracy jest przedstawienie aktualnych informacji na temat molekularnych i komórkowych mechanizmów regeneracji i reorganizacji mięśni szkieletowych, roli cytokin i czynników wzrostu w proliferacji komórek satelitarnych oraz możliwości terapeutycznego wykorzystania komórek macierzystych pochodzenia mięśniowego w medycynie regeneracyjnej.

Słowa kluczowe: cytokiny, czynniki wzrostu, komórki macierzyste mięśni, transplantacja

SUMMARY

The skeletal muscles regeneration is characterized by a sequence of events consisting of degeneration, inflammatory and immune response, regeneration and remodelling. The process is regulated by molecules such as cytokines, growth factors, erythropoietin, enzymes, and reactive oxygen and nitrogen species (RONS) released by muscle, immune, epithelial and interstitial cells. Some molecules stimulate the proliferation and growth of muscle cells while others can inhibit these processes. For several years, cytokines and growth factors have been used in regenerative medicine in the form of platelet concentrate or recombinant proteins. There have also been attempts to use muscle cells and muscle-derived stem cell (MDSC) cultures, which contain satellite cells, mesoangioblasts and pericytes, as well as isolated satellite cells or myoblasts.

The aim of the paper is to present current knowledge concerning the molecular and cellular mechanisms of regeneration and remodelling of skeletal muscles, the role of cytokines and growth factors in the proliferation of satellite cells, and also the possibilities of therapeutic use of muscle-derived stem cells in regenerative medicine.

Key words: cytokines, growth factors, muscle-derived stem cells, transplantation

WSTĘP

Mięśnie szkieletowe stanowią od 30% do 40% masy ciała, umożliwiają poruszanie, utrzymanie prawidłowej postawy oraz uczestniczą w procesie oddychania. Składają się z równoległych wiązek włókien mięśniowych o długości kilku centymetrów i średnicy 10-100 μm , otoczonych warstwą tkanki łącznej otaczające pęczki włókien mięśniowych. Tkanka łączna wprowadza naczynia krwionośne i pęczki włókien nerwowych. Każde włókno jest pojedynczą, dużą wielojądrową komórką zwaną miocytem. Od 2% do 7% jąder komórkowych związanych z jednym włóknem mięśniowym należy do komórek macierzystych (ang. *muscle-derived stem cells*, MDSC) położonych pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną włókien, aktywowanych podczas odpowiedzi na wysiłek, urazy i choroby degeneracyjne mięśni [1,2].

KOMÓRKI MACIERZYTE; POTENCJAŁ REGENERACYJNY MIĘŚNI

Komórki macierzyste (ang. *stem cells*, SC) zachowują zdolność do samoodnowy przez cały okres życia organizmu. W zależności od etapu rozwoju ontogenetycznego człowieka, komórki SC dzieli się na dwie grupy – komórki macierzyste embrionalne (ang. *embryonal stem cells*, ESC) i nieembrionalne, czyli somatyczne lub inaczej dojrzałe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*, ASC). Komórki embrionalne stanowią wewnętrzną masę komórek zarodka, są zdolne do nieskończonej liczby symetrycznych podziałów i mogą dać początek wszystkim typom tkanek. Oznacza to, że ESC są pluripotenne. Natomiast nieembrionalne komórki macierzyste mogą być multipotentne, gdy różnicują się w więcej niż jeden typ komórek potomnych lub unipotentne, gdy różnicują się w obrębie jednej linii komórkowej [3].

Komórkami macierzystymi są komórki satelitarne mięśni (ang. *muscle-derived stem cells*, MDSC), które zostały odkryte w 1961 roku przez Aleksandra Mauro w dojrzałym włóknie mięśniowym kończyny płaza [4].

Komórki satelitarne stanowią aktywną mitotycznie grupę komórek, których liczba zmienia się w zależności od wieku, typu włókna mięśniowego i aktywności fizycznej. Komórki satelitarne nie są jednorodną populacją komórek. Ze względu na funkcje podzielono je na komórki nieaktywne mitotycznie odpowiedzialne za wzrost i aktywne mioblasty odpowiedzialne za regenerację [5]. Według Mackey'a i wsp. około 1,3% komórek satelitarnych jest mitotycznie aktywnych, a pod wpływem wysiłku fizycznego ich liczba wzrasta wielokrotnie (Tab. 1) [6].

BACKGROUND

Skeletal muscles make up 30-40% of body mass. They make possible movement and keep proper posture and contribute to the breathing process. They are made up of parallel muscle fibre fascicles. The fibres are a few centimetres long and have the diameter of 10-100 μm . They are covered with a layer of connective tissue surrounding bundles of muscle fibres. The connective tissue serves to introduce blood vessels and bundles of nerve fibres. Each muscle fibre is a single large multinucleated cell and is called a myocyte. 2-7% of cell nuclei associated with one muscle fibre are stem cells (*muscle-derived stem cells*, MDSC) located between the sarcolemma and the fibre's basement membrane and activated during a response to physical effort, injuries or degenerative muscle disease [1,2].

STEM CELLS; REGENERATIVE POTENTIAL OF MUSCLES

Stem cells (SC) preserve the ability to self-renew during the whole life of the body. Depending on the stage of ontogenic development in humans, SC cells can be divided into two groups: embryonic stem cells (ESC) and non-embryonic called somatic or adult stem cells (ASC). Embryonic cells constitute the inner cell bulk of the embryo. They have the capacity to divide symmetrically an infinite number of times and may develop into any kind of tissue. In other words, ESC cells are pluripotent, while non-embryonic stem cells can be multipotent, when they differentiate into more than one daughter cell type, or unipotent, when they differentiate into only one cell type [3].

Muscle-derived stem cells (MDSC), called satellite cells, were discovered by Alexander Mauro in a mature muscle fibre of an amphibian's limb in 1961 [4].

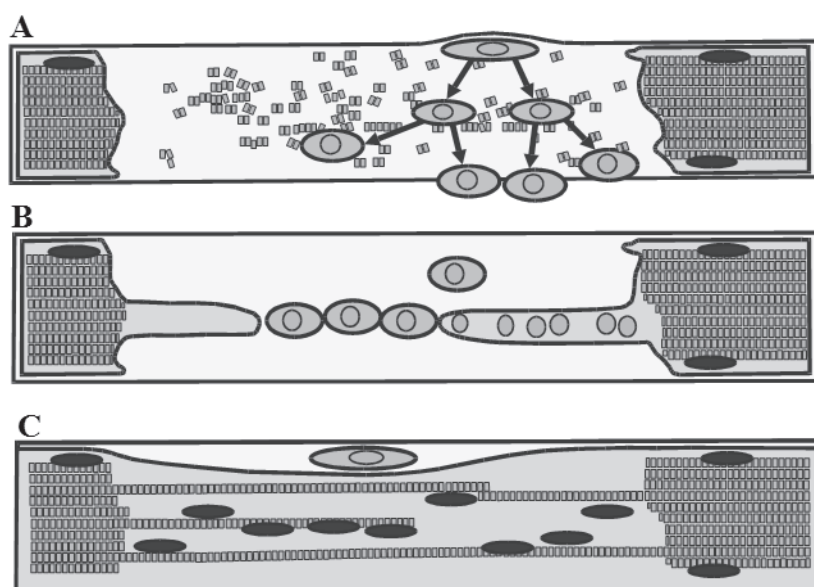
Satellite cells are a group of mitotically active cells whose number depends on age, type of muscle fibre, and physical activity. Satellite cells are not a homogeneous cell population. They can be divided with regard to their function into mitotically inactive ones, responsible for growth, and active myoblasts, responsible for regeneration [5]. According to Mackey et al., about 1.3% satellite cells are mitotically active and their number increases several times in response to exercise (Table 1) [6].

As a result of injury or trauma satellite cells become activated, divide, differentiate, become elongated, adhere to one another and undergo fusion, forming multinucleated myotubes which later become muscle fibres (Fig. 1). Myoblast fusion is a key regeneration event during which cells express a num-

Tab. 1. Wpływ wysiłku fizycznego na liczbę komórek satelitarnych [6]

Tab. 1. The effect of exercise on the number of satellite cells [6]

WYSIŁEK EXERCISE	BADANI SUBJECTS	ZMIANY LICZBY KOMÓREK SATELITARNYCH CHANGES IN NUMBER OF SATELLITE CELLS	PIŚMIENNICTWO REFERENCES
Pojedyncza biopsja Single biopsy	ciężarowcy vs. nietreningujący power lifters vs. non-athletes	70%-100% więcej u ciężarowców niż u nietreningujących 70%-100% more in power lifters than in non-athletes	[7,8]
Pojedyncza próba: wysiłek ekscentryczny Single bout: eccentric exercise	nietreningujący młodzi vs. starsi mężczyźni untrained young men vs. old men	24 h po wysiłku: ↑141% młodzi, ↑51% starsi 24 h post-exercise: ↑141% (young), ↑51% (old)	[9,10]
Pojedyncza próba: 36 km bieg Single bout: 36 km run	sportowcy athletes	4 dni po wysiłku: ↑192% 4 days post-exercise: ↑192%	[6]
14 tyg. trening wytrzymałościowy 14-wk endurance training	aktywni starsi mężczyźni active older men	8 dni po: ↑27% 8 days after: ↑27%	[11]
10 tyg. trening siłowy 10-wk strength training	nietreningujący młodzi mężczyźni non-trained young men	↑29%	[12]
16 tyg. trening siłowy 16-wk strength training	nietreningujący młodzi vs. starsi mężczyźni non-trained young men vs older men	↑ wyłącznie u młodych mężczyzn ↑ in young men only	[13]



Ryc. 1. Etapy regeneracji mięśni szkieletowych. A – proliferacja i migracja komórek satelitarnych, różnicowanie, B – wydłużanie, przyleganie i fuzja mioblastów, C – uzupełnianie puli komórek satelitarnych, regeneracja i hipertrofia mięśni [1; modyfikacja własna]

Fig. 1. Stages of skeletal muscle regeneration. A – proliferation and migration of satellite cells, differentiation, B – myoblast elongation, adherence and fusion, C – replenishing the satellite cell pool, regeneration and muscle hypertrophy [1; modified by authors]

W odpowiedzi na uraz lub uszkodzenie komórki satelitarne są aktywowane, dzielą się, różnicują, wydłużają, przylegają do siebie i ulegają fuzji tworząc wielojądrowe miotuby, z których powstają włókna mięśniowe (Ryc. 1). Fuzja mioblastów jest jednym z kluczowych etapów regeneracji, w trakcie którego komórki wykazują ekspresję szeregu białek m.in. białek adhezyjnych zaangażowanych w tworzenie połączeń pomiędzy mioblastami. Najważniejsze białka adhezyjne uczestniczące w fuzji ludzkich mioblastów to M-cadheryna, białko ADAM12 (ang. *a disintegrin and metalloproteinase 12*), podjednostka $\alpha 3$ integryny oraz tetraspaniny CD9 i CD81. Część aktywowanych komórek satelitarnych nie różnicuje się w kierunku włókien mięśniowych, ale odtwarza własną populację. Główną rolę w tym procesie przypisuje się czynnikowi transkrypcyjnemu Pax7 [14].

Regeneracyjny potencjał komórek satelitarnych jest niezwykle. Wykazano, że zaledwie siedem komórek satelitarnych zasocjowanych z jednym włóknem mięśniowym może odtworzyć setki nowych miocytów zawierających tysiące jąder komórkowych. Regeneracja mięśni szkieletowych jest też wspomagana w skrajnych przypadkach przez komórki niemięśniowe, jak obecne we krwi hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC) [15].

MOLEKULARNE MECHANIZMY REGENERACJI MIĘŚNI

Naprawa mięśni szkieletowych obejmuje cztery powiązane ze sobą fazy (Ryc. 2). Pierwsza, to nekroza wywołana napływem jonów wapnia do sarkoplazmy z powodu uszkodzenia błony komórkowej i retikulum sarkoplazmatycznego podczas wysiłku. Wzrost stężenia Ca^{2+} aktywuje enzymy proteolityczne, które katalizują rozpad białek błonowych, cytoszkieletu i białek kurczliwych, doprowadzając do zaburzenia funkcji sarkomerów i śmierci. W fazie nekrozy obserwuje się wysoki poziom białek komórkowych we krwi, jak np. kinaza kreatynowa, dehydrogenaza mleczanowa, b-galaktozydaza, troponina [16].

Zmiany nekrotyczne włókien mięśniowych prowadzą do miejscowego stanu zapalnego, zapoczątkowanego uwalnianiem czynników chemotaktycznych oddziałujących na komórki immunologiczne rozpoczynające proces naprawy – faza odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Neutrofile pojawiają się w miejscu uszkodzenia w ciągu kilku godzin i są obecne do 24 godzin, następnie wkraczają makrofagi obecne do 14 dni po wysiłku. Aktywowane neutrofile i makrofagi usuwają fragmenty uszkodzonej tkanki mięśniowej, uwalniając ponad sto różnych cząsteczek biorących

ber of proteins, including adhesive proteins involved in building connections between myoblasts. The most important adhesive proteins taking part in human myoblast fusion are M-cadherin, ADAM12 (a disintegrin and metalloproteinase 12), integrin $\alpha 3$ -subunit, and tetraspanins CD9 and CD81. Some activated satellite cells do not differentiate into muscle fibres but reconstruct their own population. The main role in this process is ascribed to transcription factor Pax7 [14].

The regenerative potential of satellite cells is extraordinary. It has been shown that as few as seven satellite cells associated with one muscle fibre can recreate hundreds of new myocytes comprising thousands of cell nuclei. In extreme cases, skeletal muscle regeneration is supported by non-muscle cells, such as haematopoietic stem cells (HSC) present in blood [15].

MOLECULAR MECHANISMS OF MUSCLE REGENERATION

The skeletal muscles repair is characterized by a sequence of events consisting of degeneration/necrosis, inflammatory and immune response, regeneration and remodelling, as described below in detail and illustrated in Figure 2. Necrosis is caused by inflow of calcium ions into the sarcoplasm due to damage to the cell membrane and sarcoplasmic reticulum during exercise. Increased Ca^{2+} concentration activates proteolytic enzymes which are responsible for disintegration of membrane, cytoskeleton and contractile proteins, leading to disturbance of sarcomere function and finally to cell death. In the degenerative phase, the blood levels of cell proteins, such as creatine kinase, lactate dehydrogenase, β -galactosidase and troponin are elevated [16].

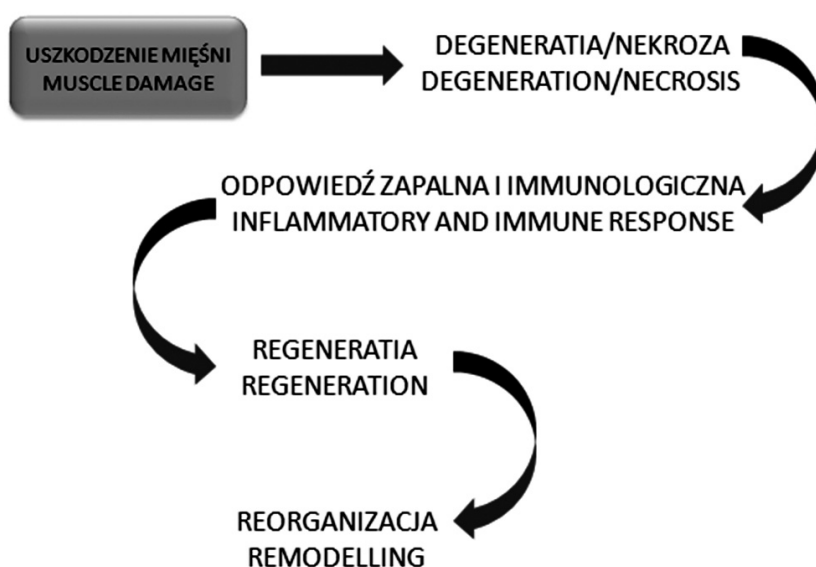
Necrotic changes in muscle fibres lead to local inflammation which begins with the release of chemotactic factors inducing immunological cells to initiate repair processes (inflammatory and immune response phase). Neutrophils appear at the site of damage within a few hours and are present for up to 24 hours. They are followed by macrophages, which remain there for up to 14 days after exercise. Activated

udział w procesach naprawczych. Do tych cząstek należą cytokiny, czynniki wzrostu, erytropoetyna, enzymy (kolagenaza, lipazy, fosfatazy, nukleazy, glikozydazy, proteazy) oraz reaktywne formy tlenu i azotu (ang. *reactive oxygen and nitrogen species*, RONS). Kumulacja RONS w uszkodzonych włóknach mięśniowych sprzyja regeneracji i reorganizacji (ang. *remodelling*) mięśni i adaptacji do wysiłku fizycznego. RONS biorą udział m.in. w aktywacji koaktywatora transkrypcji PGC-1 α , który reguluje kilkadziesiąt genów. Aktywacja PGC-1 α , leży u podstaw adaptacji do wysiłku fizycznego [17].

Faza regeneracji mięśni, która trwa do 5 dni od uszkodzenia, obejmuje aktywację i różnicowanie sąsiadujących komórek satelitarnych. Promotorem różnicowania są jądrowe białka regulatorowe rodziny MRF (ang. *myogenic regulatory factor*), jak MyoD, Myf5, miogenina i Mrf-4, które występują wyłącznie w komórkach miogennych mięśni szkieletowych. Białka

neutrophils and macrophages remove fragments of damaged muscle tissue, releasing over hundred different molecules involved in repair processes. These molecules include cytokines, growth factors, erythropoietin, enzymes (collagenase, lipases, phosphatases, nucleases, glycosidases, and proteases) as well as reactive oxygen and nitrogen species (RONS). The accumulation of RONS in damaged muscle fibres promotes muscle regeneration and remodelling and their adaptation to exercise. RONS are involved, among others, in the activation of transcriptional coactivator PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α) that regulates expression of many genes. PGC-1 α plays a pivotal role in endurance exercise-induced muscle adaptation [17].

The phase of muscle regeneration, which continues for up to 5 days after an injury, involves the activation and differentiation of satellite cells. Differentiation is triggered by nuclear regulatory proteins belong-



Ryc. 2. Fazy naprawy mięśni szkieletowych [1]

Fig. 2. Phases of skeletal muscle repair [1]

Tab. 2. Wpływ czynników wzrostu na proliferację komórek satelitarnych i fuzję mioblastów [19,23,29,30]

Tab. 2. Influence of growth factors on satellite cells proliferation and myoblast fusion [19,23,29,30].

CZYNNIK WZROSTU GROWTH FACTOR	PROLIFERACJA PROLIFERATION	FUZJA FUSION
FGF-1 (basic fibroblast growth factor 1)	stymuluje /stimulates	stymuluje /stimulates
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	stymuluje /stimulates	stymuluje /stimulates
NGF (nerve growth factor)	stymuluje /stimulates	stymuluje /stimulates
BDNF (brain-derived neurotrophic factor)	stymuluje /stimulates	stymuluje /stimulates
LIF (leukaemia inhibitory factor)	stymuluje /stimulates	stymuluje /stimulates
PDGF-BB (platelet-derived growth factor, BB form)	stymuluje /stimulates	hamuje/inhibits
FGF-2 (acidic fibroblast growth factor 2)	hamuje/inhibits	stymuluje /stimulates
PDGF-AA (platelet-derived growth factor, AA form)	hamuje/inhibits	hamuje/inhibits
EGF (epidermal growth factor)	hamuje/inhibits	hamuje/inhibits
TGF- α (transforming growth factor α)	hamuje/inhibits	hamuje/inhibits
TGF- β (transforming growth factor β)	hamuje/inhibits	hamuje/inhibits

MRF tworzą kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi E12, E47 i MEF2 (ang. *myogenic enhancers factor 2*). Powstający układ transkrypcyjny uruchamia syntezę takich białek mięśniowych, jak desmina, łańcuchy lekkie i ciężkie miozyny, kinaza kreatynowa, receptor acetylocholino i in. [18].

Ostatnia faza – reorganizacji jest kulminacyjnym etapem działania cząsteczek wytwarzanych podczas nekrozy oraz odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Wzrost stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) oraz nadtlenu wodoru i tlenku azotu (RONS) bezpośrednio lub pośrednio aktywują szereg białek, jak kalmodulina, kalcyneuryna, CaMKs (rodzina kinaz serynowo-treoninowych zależnych od kalmoduliny i wapnia), p38MAPK (ang. *p38 mitogen-activated protein kinases*), MEF2 (ang. *myogenic enhancers factor 2*, aktywuje rejon promotorowy GLUT4), ATF2 (ang. *activating transcription factor 2*) oraz PGC-1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1a*) kluczowy regulator przystosowania mięśni do intensywnego wysiłku [19].

UDZIAŁ CYTOKIN I CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH W REGENERACJI MIĘŚNI

Odbudowa uszkodzonych mięśni szkieletowych jest wysoce zsynchronizowanym procesem kontrolowanym przez mechanizmy obejmujące interakcje komórka « komórka i komórka » środowisko zewnątrzkomórkowe. W mechanizmach tych uczestniczą cytokiny pro- i przeciwzapalne (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 i TNF α) oraz czynniki wzrostowe (HGF, PDGF-BB, FGF, IGF-I, BDNF, LIF, TGF, NGF) uwalniane w ciągu kilku godzin z leukocytów i komórek mięśniowych w odpowiedzi na uszkodzenie lub uraz. Łącząc się z odpowiednim receptorem oddziałują na te same komórki, które je wydzielają (działanie autokrynowe), na komórki w najbliższym sąsiedztwie (działanie parakrynowe) lub na komórki znajdujące się w innych narządach (działanie endokrynowe) [1,19].

U osób aktywnych fizycznie poziom cytokin i czynników wzrostowych jest podwyższony, czego konsekwencją jest większa liczba komórek satelitarnych, wyższy potencjał regeneracyjny mięśni i szybszy powrót do formy po przebytych urazach w porównaniu do osób nietreningujących [20].

Od kilku lat cytokiny i czynniki wzrostowe są stosowane w medycynie regeneracyjnej w formie koncentratu płytek krwi otrzymywanego przez wirowanie krwi autogennej lub w formie preparatów rekombinowanych, jak hrBMPs (ang. *human recombinant bone morphogenic proteins*), hrTGF β (ang. *hu-*

ing to the family of proteins known as myogenic regulatory factors (MRFs), including MyoD, Myf5, myogenin and MRF-4, which appear only in the myogenic cells of skeletal muscle. MRF proteins are complexed with transcription factors such as E12, E47 and MEF2 (myogenic enhancer factor 2). The ensuing transcription complex initiates synthesis of muscle proteins such as desmin, light and heavy myosin chains, creatine kinase, acetylcholine receptor, and others [18].

The last stage, remodelling, is the climax of activity of the molecules produced during the necrotic stage and the inflammatory and immune response. The increase in Ca^{2+} and oxygen peroxide and nitric oxide (RONS) directly or indirectly activates a number of proteins such as calmodulin, calcineurin, CaMKs (a family of calmodulin- and calcium-dependent serine-threonine kinases), p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK), myogenic enhancer factor 2 (MEF2, which activates the GLUT4 promoter region), activating transcription factor 2 (ATF2) and PGC-1 α [19].

CONTRIBUTION OF CYTOKINES AND GROWTH FACTORS TO MUSCLE REGENERATION

Reconstruction of damaged skeletal muscles is a highly synchronised process controlled by mechanisms involving cell-cell and cell-extracellular environment interactions. These mechanisms involve pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 and TNF α) and growth factors (HGF, PDGF-BB, FGF, IGF-I, BDNF, LIF, TGF, NGF) released from leucocytes and muscle cells within a few hours after muscle damage. By binding to specific receptors, they exert an effect on the cells which produce them (autocrine signalling), cells in their nearest proximity (paracrine signalling), or cells in other organs (endocrine signalling) [1,19].

In physically active people, the level of cytokines and growth factors is elevated, which results in increased numbers of satellite cells, higher potential for muscle regeneration and faster recovery after muscle injury in comparison to inactive subjects [20].

For several years cytokines and growth factors have been used in regenerative medicine in the form of platelet concentrates obtained by centrifugation of autogenic blood or in the form of recombinant preparations, such as human recombinant bone morphogenic proteins (hrBMPs), human recombinant transforming growth factor β (hrTGF β), human recombinant insulin-like growth factor (hrIGF), human recombinant platelet derived growth factor (hrPDGF)

man recombinant transforming growth factor β), hrIGF (ang. *human recombinant insulin-like growth factor*), hrPDGF (ang. *human recombinant platelet derived growth factor*), hrBDNF (ang. *human recombinant brain-derived neurotrophic factor*) w celu przyspieszenia procesu gojenia i naprawy uszkodzonych tkanek [21,22].

Zastosowanie koncentratu płytek krwi (ang. *platelet-rich plasma*, PRP) w urazach mięśni stymuluje odpowiedź zapalną i immunologiczną (druga faza regeneracji mięśni) i tym samym wzmacnia cały proces odbudowy uszkodzonych włókien mięśniowych. W modelu mysim zastosowanie PRP zwiększyło poziom czynników wzrostu IGF-I i FGF, przyspieszyło gojenie i zwiększyło siłę skurczu mięśni w porównaniu do grupy kontrolnej [23]. Sanchez i wsp. zastosowali koncentrat płytek o bardzo wysokiej zawartości czynników wzrostowych (ang. *plasma rich in growth factors*, PRGF) nie zawierający leukocytów [24]. Zastosowanie takiego preparatu spowodowało skrócenie czasu gojenia o połowę w stosunku do oczekiwanego.

Silne działanie anaboliczne wykazują cytokiny przeciwzapalne IL-6, IL-8 i IL-15, które zwiększają masę mięśni niezależnie od poziomu czynników wzrostowych [19]. Uszkodzenie genu IL-6 znosi zdolność komórek satelitarnych do podziałów i osłabia przyrost mięśni [25]. IL-6, IL-8 i IL-15 indukują także wydzielanie naczyniowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), który pobudza angiogenezę i zmniejsza powysiłkowe bóle mięśni [19,26].

Obecność w mięśniach cytokin prozapalnych może wywierać dwójaki efekt. IL-1 β , IL-18 i TNF α uczestniczą w rekonstrukcji uszkodzonych włókien mięśniowych poprzez aktywację fagocytów i enzymów proteolitycznych oraz stymulację wytwarzania czynników wzrostowych regulujących proliferację i różnicowanie komórek satelitarnych, neuronalnych i śródbłonna naczyń krwionośnych [27,28]. Udział TNF α w procesach naprawczych potwierdzono w badaniach z zastosowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które obniżyły poziom TNF α i jednocześnie opóźniły odbudowę uszkodzonych włókien mięśniowych u biegaczy długodystansowych [6]. Z drugiej strony, utrzymujący się powyżej 5 dni wysoki poziom IL-1 β i TNF α hamuje transport glukozy i syntezę białka, zaburza fosforylację oksydacyjną i indukuje apoptozę komórek satelitarnych, co w konsekwencji wywołuje spadek zdolności regeneracyjnych, masy i siły mięśni [28].

W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że czynniki wzrostowe podobnie jak cytokiny, wykazują różną aktywność tzn. jedne silnie stymulują proliferację i wzrost komórek mięśniowych, inne mogą hamować (Tab. 2).

and human recombinant brain-derived neurotrophic factor (hrBDNF), in order to accelerate the repair and healing of damaged tissue [21,22].

Platelet-rich plasma (PRP) is used in the treatment of muscle injury to stimulate the inflammatory and immune response (the second phase of muscle regeneration), thereby enhancing the entire process of damaged skeletal muscle fibre reconstruction. The use of PRP in a mouse model increased the level of growth factors IGF-I and FGF, accelerated healing and increased the strength of muscle contraction in comparison to the control group [23]. Sanchez et al. [24] used a plasma concentrate rich in growth factors (PRGF) which did not contain leucocytes. The time of healing was reduced by half in comparison to the expected time.

The anti-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and IL-15, which increase muscle mass independently from growth factors, have a strong anabolic effect [19]. Knockout of IL-6 gene makes satellite cells unable to divide and weakens the muscle hypertrophy [25]. IL-6, IL-8 and IL-15 also induce the release of the vascular endothelial growth factor (VEGF) that stimulates angiogenesis and reduces post-exercise muscle soreness [19,26].

The present of pro-inflammatory cytokines in muscles can induce opposite effects. IL-1 β , IL-18 and TNF α are involved in the reconstruction of damaged muscle fibres by activating phagocytes and proteolytic enzymes and stimulating production of growth factors which regulate the proliferation and differentiation of satellite and neuronal cells and the vascular endothelium [27,28]. The involvement of TNF α in repair processes has been confirmed in studies involving non-steroidal anti-inflammatory agents, which decreased TNF α levels and simultaneously delayed reconstruction of damaged muscle fibres in long-distance runners [6]. However, high levels of IL-1 β and TNF α for more than 5 days inhibit glucose transport and protein synthesis, disturb oxidative phosphorylation and induce apoptosis of satellite cells in consequence limiting regenerative capabilities, mass and strength of skeletal muscles [28].

In vitro studies have demonstrated that, just like cytokines, growth factors display diverse activities: some of them strongly stimulate proliferation and muscle cell growth while other may inhibit these processes (Table 2).

TRANSPLANTACJA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH

Według Quintero i wsp. w sporcie uszkodzenia mięśni stanowią 35-55% stwierdzanych urazów i kontuzji, których główną przyczyną są przeciążenia układu mięśniowego [16]. Około 80% urazów mięśni kończy się trzytygodniową przerwą, pozostałe wymagają interwencji ortopedycznej. Obecnie podejmowane są próby wykorzystania komórek mięśniowych w terapii regeneracyjnej urazów i chorób degeneracyjnych mięśni. Pierwsze doświadczenia z przeszczepianiem komórek pochodzenia mięśniowego przeprowadzono pod koniec lat 70-tych na modelach zwierzęcych, a w latach 90-tych wykonano pierwsze próby kliniczne [5]. Następnie, dzięki opracowaniu metody kontrolowania procesu różnicowania się komórek macierzystych w określone linie komórkowe możliwe stało się tworzenie *in vitro* hodowli komórkowych. Do transplantacji wykorzystywane są najczęściej trzy rodzaje wyizolowanych linii. Pierwsza oparta jest na komórkach pochodzenia mięśniowego (ang. *muscle-derived stem cells*, MDSC), w której obok komórek satelitarnych mięśni znajdują się również mezoangioblasty i perycyty. Druga zawiera wyizolowane komórki satelitarne, a trzecia mioblasty. Badania wykazały, że MDSC mają największy potencjał regeneracyjny, gdyż obok przekształcania się w fibroblasty, mogą różnicować się tworząc komórki krwi, osteoblasty, adipocyty, czy chondrocyty [29]. Podczas badań na myszach z zastosowaniem MDSC zaobserwowano silne zależności między płcią dawcy i biorcy. Procesy regeneracji i naprawy mięśni zachodziły sprawniej po zastosowaniu komórek pochodzących od samic, natomiast regeneracja ścięgien i kości po użyciu hodowli uzyskanych z komórek pobranych od samców. Kiedy dawca i biorca byli tej samej płci, przeżywalność komórek była większa u samic niż samców. Do tej pory nie potwierdzono takich zależności u ludzi [16].

Pomimo doskonalenia technik inżynierii tkankowej, przeprowadzenie transplantacji komórkowych nadal wiąże się z poważnymi problemami, jak słaba przeżywalność komórek spowodowana silną reakcją zapalną i immunologiczną biorcy, generacją RONS i apoptozą. W celu zwiększenia efektywności transplantacji wykonuje się przeszczepy autologiczne, podejmuje się próby osłabienia reakcji zapalnej poprzez zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko cytokinom prozapalnym, głównie przeciw cytokinie IL-1 β , której stężenie wzrasta w ciągu 24 h po przeszczepie. Ogranicza adhezję neutrofilów i limfocytów blokując aktywność cząsteczek adhezyjnych, takich jak selektyny i integryny. Stosuje się

MUSCLE CELL TRANSPLANTATION

According to Quintero et al. [16], muscle injuries account for up to 35-55% of all sports injuries caused by overload of the muscle system. About 80% of muscle injuries require prolonged recovery period, while the rest of them require orthopaedic intervention. Attempts are currently being made to use muscle cells in the regenerative therapy of injuries and degenerative muscle disease. Early experiments involving transplantation of muscle cells were conducted in animals in the late 1970s. The first clinical trials were conducted in the 1990s [5]. Subsequently, thanks to a newly developed method for controlling the differentiation of stem cells into specific cell lines, it became possible to create *in vitro* cell cultures. Three types of cell lines are most frequently used for transplantation. One method relies on muscle-derived stem cells (MDSC), including not only satellite muscle cells but also mesoangioblasts and pericytes. Another one involves isolated satellite cells, and the third one, myoblasts. Research shows that MDSCs have a bigger potential for regeneration, since apart from transforming into fibroblasts they may also differentiate into blood cells, osteoblasts, adipocytes and chondrocytes [29]. Murine studies of MDSC revealed a strong correlation between the gender of the donor and recipient. Muscle regeneration and repair processes were more efficient when cells harvested from females were used, while the regeneration of tendons and bones was more efficient in the presence of cells obtained from males. When both the donor and the recipient were of the same sex, cell survival was higher in females than in males. Such relationships have not been confirmed in people to date [16].

Despite continuing improvement of tissue engineering methods, cell transplantation is still beset with serious problems, such as poor cell survival caused by an intense inflammatory and immune response of the recipient, RONS formation and apoptosis. Solutions aiming to increase the effectiveness of transplantations include autologous transplantation; attempts to suppress the inflammatory response by using antibodies against pro-inflammatory cytokines (especially IL-1 β cytokine, whose concentration increases within 24 hours after transplantation); limiting neutrophil and lymphocyte adhesion by suppressing the activity of adhesive molecules such as selectins and integrins; or preincubation with antioxidants, such as N-acetylcysteine, ascorbate or superoxide dismutase, which limits oxidative stress and increases cell survival two-fold after reimplantation

preinkubację z antyoksydantami, jak N-acetylocysteina, askorbinian lub dysmutaza ponadtlenkowa, co ogranicza stres oksydacyjny i dwukrotnie zwiększa przeżywalność komórek po reimplantacji [5,29,30]. Selekcjonuje się komórki podczas hodowli. Zaobserwowano, że najlepiej przeżywają komórki, które najwolniej przylegały do podłoża i wykazywały ekspresję desminy w 75% populacji. Dla porównania, komórki uzyskane z izolowanych włókien mięśniowych, wykazujące ekspresję desminy w ponad 95% populacji, gwałtownie umierały po przeszczepie (tracono 96% komórek w ciągu 48 godzin po zabiegu) [5]. Poprawia dystrybucję transplantowanych komórek (ang. *homing*) przez zastosowanie SDF-1 lub TNF α , które są silnymi chemoatraktantami i w znaczący sposób ułatwiają migrację komórek [31]. Wykorzystuje się także techniki inżynierii genetycznej, jak transferowanie podawanych mioblastów genem kodującym antagonistę receptora interleukiny 1 β lub genem kinazy Akt, która chroni komórki przed niszczącym działaniem czynników apoptycznych. Zaobserwowano, że wymienione zabiegi znacznie zmniejszają odsetek komórek ginących po 48, 72 i 120 godzinach od transplantacji. Opracowuje się również metody uodparniania przeszczepionych komórek bez konieczności stosowania terapii genowej. Jak wcześniej wspomniano może to być tzw. hartowanie, czyli poddawania komórek działaniu czynników fizycznych, jak wysoka temperatura (42–43°C) lub hipoksja, które stymulują ekspresję białek ochronnych Hsp [5,29,30].

Podejmowane są także próby poszukiwania populacji somatycznych komórek macierzystych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w rekonstrukcji mięśni szkieletowych. Kilka lat temu rozpoczęto badania nad zastosowaniem mezoangioblastów (ang. *mezoangioblasts*, MABs) i komórek mezenchymalnych szpiku kostnego (ang. *bone-marrow-derived satellite cells*, BMCSs), które nadal są w fazie badań przedklinicznych. W 2005 roku po raz pierwszy opisano zdolność komórek macierzystych pochodzących ze zrębu tkanki tłuszczowej (ang. *adipose-derived stem cells*, *adipose-derived stromal cells*, ADSC) do regeneracji mięśni i ekspresji dystrofiny w mysim modelu dystrofii Duchenn'a. Jednak obecnie realizowane badania kliniczne nie obejmują zastosowania ADSC w regeneracji uszkodzonych miocytów [32]. W ubiegłym roku na łamach *Nature Cell Biology* naukowcy z Uniwersytetu Piotra i Marii Curie opublikowali wyniki badań nad populacją komórek interstycjalnych PICs (ang. *PW1⁺/Pax7⁺ interstitial cells*) rezydujących między włóknami mięśniowymi. PIC charakteryzują się wyższym potencjałem regeneracyjnym i samoodnawialnością niż do tej pory badane

[5,29,30]. Another solution is cell selection during culturing. It has been observed that cells which were the slowest to adhere to the substrate and showed desmin expression in 75% of the population had the highest survival rate in comparison to cells obtained from isolated muscle fibres, which expressed desmin in over 95% of the population and would suddenly die after transplantation (96% of cells was lost within 48 hours after transplantation) [5]. The homing of transplanted cells is improved by using SDF-1 or TNF α , which are potent chemoattractants and significantly facilitate cell migration [31]. Genetic engineering techniques are also used, such as transformation of the myoblasts with a gene which codes for an interleukin 1 β receptor antagonist or the gene of the Akt kinase, which protects cells from the destructive effect of apoptotic factors. It has been observed that these solutions significantly decrease the rate of cell death at 48, 72 and 120 hours after transplantation. Methods to make transplanted cells resistant without the use of genetic engineering techniques are also being developed. As mentioned above, it this can be achieved by hardening, i.e. exposing cells to high temperature (42–43°C) or hypoxia which stimulate the expression of proteins Hsp [5,29,30].

There have also been attempts to find populations of somatic stem cells that could be used in skeletal muscle reconstruction. Several years ago, studies on the use of mesoangioblasts (MABs) and bone-marrow-derived satellite cells (BMCSs) were started. These studies are still in the preclinical phase. In 2005, the regenerative abilities of adipose-derived stem/stromal cells (ADSC) were described for the first time following the discovery of their ability to induce muscle regeneration and dystrophin expression in a mouse model of Duchenne's muscular dystrophy. However, current studies do not involve the use of ADSC in the regeneration of damaged myocytes [32]. Last year, in *Nature Cell Biology*, scientists from the University of Pierre and Marie Curie published the results of studies on a population of PW1⁺/Pax7⁺ interstitial cells (PIC) found between muscle fibres. They have higher regeneration and self-regeneration potential than the stem cells that have been used in skeletal muscle reconstruction to date. A characteristic of these cells is the non-expression of the Pax7 transcription factor, and the expression of the Pw1 factor, which co-regulates the NF κ B-TNF α signalling pathway [33,34]. According to information published in the EuroStemcells European Project portal, the discovery of these cells offers hopes of improved effectiveness of stem cell transplantations in degenerative diseases and posttraumatic skeletal muscle remodelling (www.eurostemcells.org).

komórki macierzyste wykorzystywane w rekonstrukcji mięśni szkieletowych. Cechą charakterystyczną tych komórek jest brak ekspresji czynnika transkrypcyjnego Pax7, a ekspresja czynnika Pw1 współuczestniczącego w regulacji szlaku sygnalizacyjnego NFκB-TNFα [33,34]. Odkrycie tych komórek, zgodnie z informacjami zamieszczonymi na portalu europejskiego projektu *EuroStemCells* jest nadzieją na poprawę efektywności transplantacji komórek macierzystych w chorobach degeneracyjnych i pourazowej rekonstrukcji mięśni szkieletowych (www.eurostemcells.org).

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209-238.
2. Morgan JE, Partridge RA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 1151-1156.
3. Sikora MA, Olszewski WL. Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Hig Med*. Dos 2004; 58: 202-208
4. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961; 9: 493-495.
5. Burdzińska A, Berwid S, Orzechowski A. Transplantacje komórek mięśniowych – oczekiwania, możliwości i ograniczenia. *Postępy Hig Med Dos* 2005; 59: 299-308
6. Mackey A, Kjaer M, Dandanell S, Mikkelsen KH, Holm L, Døssing S, Kadi F, Koskinen SO, Jensen CH, Schrøder HD, Langberg H. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell response in humans. *J Appl Physiol* 2007; 103: 425-431.
7. Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol* 1999; 111: 189-195.
8. Eriksson A, Kadi F, Malm C, Thornell LE. Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 167-175.
9. Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* 2006; 33: 242-253.
10. Cramer RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schroder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B, Kjaer M. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J Physiol* 2004; 558: 333-340.
11. Charifi N, Kadi F, Feasson L, Denis C. Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve* 2003; 28: 87-92.
12. Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 2004; 558: 1005-1012.
13. Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E937-E946.
14. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 2006; 119: 1824-1832.
15. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005 ; 122: 289-301.
16. Quintero AJ, Wright VJ, Freddie HF, Huard J. Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin Sports Med* 2009; 28(1): 1-11
17. Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H. PGC-1α-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2010; 460: 153-162.
18. Kielbówna L, Kasperczyk A. Biologia komórek biogennych mięśni szkieletowych strunowców. *Postępy Biologii Komórki* 2008; 35: 291-301.
19. Pedersen KB. Muscles and their myokines. *J Exp Biol* 2011; 214: 337-348.
20. Counsel P, Bredahl W. Muscle injuries of the lower leg. *Semin Musculoskelet Radiol* 2010; 14: 162-175.
21. Mousavi K, Jasmin BJ. BDNF Is Expressed in Skeletal Muscle Satellite Cells and Inhibits Myogenic Differentiation. *J Neurosci* 2006; 26: 5739-5749.
22. Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS. Współczesne poglądy na temat wykorzystywania żelu bogato płytkowego w ortopedii i traumatologii. *Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja* 2007; 3: 227-238.
23. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 131-137.
24. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 2009; 39: 345-354.
25. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 2008; 7: 33-44.
26. Frydelund-Larsen L, Penkowa M, Akerstrom T, Nielsen S, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol* 2007; 92: 233-240.

27. Gomez-Merino D, Drogou C, Guezennec CY, Chennaoui M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine* 2007; 40: 23-29.
28. Malm C. Exercise immunology: A skeletal muscle perspective. *Exerc Immunol Rev* 2002; 8: 116-167.
29. Huard J, Gharaibeh B, Usas A. Regenerative medicine based on muscle-derived stem cells. *Oper Tech Ortop* 2010; 20: 119-126.
30. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004; 12: 311-319.
31. Quattrocelli M, Cassano M, Crippa S, Perini I, Sampaolesi M. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differentiation* 2010; 17: 1222-1229.
32. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 2011; 3: 25-33.
33. Moresi V, Pristera A, Scicchitano BM, Molinaro M, Teodori L, Sassoon D, Adamo S, Coletti D. Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response. *Stem Cells* 2008; 26: 997-1008.
34. Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sassoon DA. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nature Cell Biology* 2010; 12: 257-266.

Liczba słów/Word count: 5782

Tabele/Tables: 2

Ryciny/Figures: 2

Piśmiennictwo/References: 34

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Agnieszka Zembroń-Lacny, Zakład Medycyny Sportu i Biochemii, Zamiejscowy Wydział Kultury Fizycznej w Gorzowie Wlkp., Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu, 66-400 Gorzów Wlkp., ul. Estkowskiego 13, tel./fax: (95) 72-79-100, e-mail: a.zembron@awf-gorzow.edu.pl

Otrzymano / Received 25.06.2011 r.
Zaakceptowano / Accepted 17.01.2012 r.

