

Znaczenie cytokin prozapalnych i czynników wzrostu w regeneracji mięśni szkieletowych

MARTA MILEWSKA, KATARZYNA GRZELKOWSKA-KOWALCZYK

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Otrzymano 09.11.2015

Zaakceptowano 04.03.2016

Milewska M., Grzelkowska-Kowalczyk K.

Role of proinflammatory cytokines and growth factors in skeletal muscle regeneration

Summary

Skeletal muscle healing after injury can be divided into three distinct but overlapping phases. The destruction phase is characterized by rupture followed by necrosis of muscle fibers, formation of hematoma and inflammatory reaction. During the repair phase a necrotic tissue is phagocytosed by macrophages, muscle fibers are regenerating and connective tissue scars are formed. The remodeling phase concerns the period when regenerating muscle fibers mature, scar contraction and reorganization occurs and the muscle recovers its functional efficiency. Proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) and growth factors (FGF, IGF, TGF- β , HGF) play a critical role in all phases of muscle repair. Moreover, chemokines expressed at early stages of myogenesis can regulate the survival and proliferation of myoblasts. Chemokines expressed in vivo in muscle cells can directly influence myogenesis, but can also act in a paracrine manner by recruiting the immune cells (macrophages) to injured skeletal muscles, which is crucial for the regeneration process. Identification of molecules regulating myogenesis, like cytokines, chemokines and growth factors, contributes to the exploration of molecular mechanisms that can improve muscle regeneration after injury, diseases, surgery and increase the effectiveness of cell transplantation.

Keywords: chemokines, cytokines, muscle injury, muscle regeneration

Podstawowymi funkcjami mięśni szkieletowych są: zapewnienie lokomocji i ruchów oddechowych, zachowanie postawy, wytwarzanie ciepła oraz udział w utrzymaniu homeostazy metabolicznej. Mięśnie szkieletowe wykazują stałą zdolność do adaptacji, wywołanej przez czynniki środowiskowe i mechaniczne, zapewniającej podtrzymanie swoistych funkcji i masy tkanki. Regeneracja mięśni szkieletowych jest ściśle regulowana przez dynamiczne zależności pomiędzy czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi, kształtującymi mikrośrodowisko (tzw. „niszę”) komórek macierzystych obecnych w mięśniach szkieletowych. Postęp w rozwoju biologii komórki, biologii molekularnej i genetyki, który dokonał się w ostatnich latach, znacznie poszerzył wiedzę o wzroście i regeneracji mięśni szkieletowych, a badania nad niszą komórek macierzystych mięśni ujawniły wiele molekularnych mechanizmów kontrolujących wzrost masy mięśniowej. Przebieg miogenezy oraz rola czynników wzrostu i cytokin w rozwoju tkanki mięśniowej są identyczne u człowieka i zwierząt, stąd ich poznanie ma wymiar ogólnobiologiczny. Względna masa mięśni szkieletowych stanowi kryterium w ocenie ilości i jakości mięsa w tuszy. Wiedza o miejscowych mechanizmach kształ-

tujących niszę macierzystych komórek mięśniowych pozwala wnioskować o przebiegu procesów regeneracyjnych zachodzących w mięśniach szkieletowych po urazach i zabiegach chirurgicznych.

Znaczenie badań nad miogenezą w naukach weterynaryjnych i zootechnicznych

Powierzchniowe położenie większości mięśni w organizmie naraża je na uszkodzenie, spowodowane przez skrajne warunki termiczne lub skaleczenia, ponadto intensywny wysiłek fizyczny powoduje bezpośrednie mechaniczne zniszczenie błony komórkowej lub całych włókien mięśniowych (59). Miogeneza regeneracyjna u dorosłych osobników jest zależna od obecnych w mięśniach komórek progenitorowych, zwanych komórkami satelitowymi (32). Urazy i intensywny wysiłek fizyczny aktywują komórki satelitowe, które podejmują proliferację, różnicowanie i fuzję z sąsiadującymi włóknami mięśniowymi, co prowadzi do regeneracji uszkodzonej tkanki lub hipertrofii mięśni związanej z treningiem (57). Zjawiska zachodzące podczas miogenezy są ściśle kontrolowane przez szereg biologicznie aktywnych czynników działających endokrynnie lub lokalnie (auto-, parakrynnie), takich

jak hormony, czynniki wzrostu i różnicowania oraz cytokiny, z których jedne wywierają efekty mitogenne, pobudzając proliferację komórek, natomiast inne działają miogennie, stymulując procesy różnicowania.

Miopatie o podłożu genetycznym występują u ludzi i psów. Wśród nich najlepiej poznana jest dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a (Duchenne muscular dystrophy – DMD), recesywna choroba związana z chromosomem X, w której utrata białka dystrofiny powoduje postępującą degenerację mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego. Choroba ta dotyka 1 na 3500-7500 urodzonych dzieci (13). Dystrofia mięśniowa Beckera (BMD), w której zmodyfikowana dystrofina częściowo zachowuje swoje funkcje biologiczne, występuje 10 razy rzadziej niż DMD (47). Dystrofia mięśniowa u psów rasy golden retriever (GRDM) jest modelem dystrofii mięśniowej typu Duchenne'a (DMD), o podobnym podłożu genetycznym. Zwiększenie podatności mięśni na urazy, powtarzające się cykle degeneracji i regeneracji prowadzą do wtórnego zwłóknienia tkanki i osłabienia funkcji mechanicznej mięśni (19). Co ciekawe, objawy kliniczne dystrofii u psów są bardziej wyraźne niż u myszy mdx, co przesądza o większej wartości wyników badań prowadzonych na tym modelu doświadczalnym. Różne mutacje genu kodującego dystrofinę, występujące w DMD u ludzi, wykryto u psów ras: rottweiler, wyżeł niemiecki krótkowłose, owczarek szkocki, cocker spaniel, terier tybetański, cavalier king charles spaniel (34). Opisano również zespół wrodzonej dystrofii mięśniowej u psów rasy labrador, przypominający dystrofię mięśniową Beckera u ludzi (3). Trzyletnie osobniki dotknięte tą chorobą przejawiały postępującą utratę siły mięśni, sztywność kończyn przednich oraz wiotkość kończyn tylnych. Ocena mikroskopowa tkanki mięśniowej wykazała znaczne wahania wielkości włókien mięśniowych, przerost tkanki mięśniowej dojrzałą tkanką tłuszczową, a w badaniu immunohistochemicznym stwierdzono nieprawidłową budowę kompleksu dystrofiny (3). Ostatnie badania La Rovere i wsp. (48) wskazują na udział mechanizmów epigenetycznych (ekspresja mikroRNA) w degeneracji włókien mięśniowych u psów rasy golden retriever z dystrofią mięśniową.

Rosnące zapotrzebowanie na mięso drobiowe wymusza rozwój badań zmierzający do przyspieszenia wzrostu zwierząt, szczególnie mięśni piersiowych, oraz do poprawy skuteczności żywienia i redukcji otluszczenia. Uważa się, że selekcji zwierząt w kierunku szybkiego przyrostu masy mięśni towarzyszą histologiczne i biochemiczne modyfikacje w obrębie tkanki mięśniowej, które mogą obniżać jakość mięsa (45). Miopatie dotyczące mięśnia piersiowego u brojlerów mają wpływ na dobrostan zwierząt i są przyczyną znacznych strat ekonomicznych. Dotychczas opisane przypadki uszkodzenia mięśnia piersiowego i mięśni kończyn dolnych u ptaków domowych obejmują wrodzoną dystrofię mięśniową, skutki stresu cieplnego, urazów, niewłaściwego żywienia i działania toksyn.

W ciągu ostatnich 4 lat wzrosła liczba przypadków miopatii u brojlerów zwanej potocznie „drewnianą piersią” (52). Osobniki dotknięte chorobą nie zdradzają żadnych objawów za życia, jednak po uboju ich mięso nie trafia do konsumpcji z powodu niskiej jakości, co generuje straty ekonomiczne. Badane mięśnie cechuje twardość (potoczna nazwa tej miopatii – „drewniana piers”), a w obrazie histopatologicznym stwierdza się liczne ogniska degeneracji i regeneracji włókien mięśniowych oraz białe prążkowanie spowodowane nagromadzeniem tkanki łącznej i limfocytów (52). W innym badaniu wykazano dodatkowo zmienną wielkość włókien mięśniowych, łagodną mineralizację tkanki, zapalenie i lipidozę (35).

Wzrost mięśni szkieletowych u bydła odbywa się głównie przez zmiany w szybkości syntezy i degradacji białka, prowadzące do odkładania białka „netto” (37). Wraz z powiększaniem się rozmiarów włókien mięśniowych wzrasta zapotrzebowanie na mRNA, jako matrycę dla wzmoczonej syntezy białek, co powoduje włączanie do włókien mięśniowych dodatkowych jąder komórkowych, pochodzących z komórek satelitowych (9). Obecnie wiadomo, że działanie dodatków paszowych promujących wzrost włókien mięśniowych w dużej mierze zależy od populacji komórek satelitowych w mięśniach szkieletowych (29, 30, 53).

Hodowle mioblastów i tzw. ustalone linie komórkowe stanowią ugruntowane i powtarzalne modele badawcze miogenezy w układzie *in vitro*, umożliwiające śledzenie zjawisk związanych z różnicowaniem się komórek mięśniowych. Znaczenie cytokin i czynników wzrostu pochodzących z mięśni szkieletowych w regulacji wzrostu i rozwoju tej tkanki jest aktualnie przedmiotem intensywnych badań. Rozwój kompleksowej analizy ilościowej transkryptomu i sekretomu komórek mięśniowych, który ma miejsce w ostatnich latach, zapewnia pełniejszy wgląd w oddziaływanie auto- i parakryne w tkance mięśniowej.

Prawidłowa struktura i fazy uszkodzenia mięśni szkieletowych

Regeneracja uszkodzonej tkanki mięśniowej w znacznym stopniu jest odtworzeniem miogenezy płodowej (32), tzn. w przebiegu obu procesów dochodzi do aktywacji transkrypcji miogennych czynników regulatorowych (MRF), niezbędnych do determinacji i ostatecznego zróżnicowania mioblastów. Podstawową różnicą pomiędzy płodowym rozwojem mięśni szkieletowych a pourazową regeneracją jest udział procesu zapalnego, który poprzedza naprawę tkanki i umożliwia usunięcie zniszczonych włókien mięśniowych (43).

Gojenie się urazów mięśni można podzielić na trzy odrębne, lecz zachodzące na siebie w czasie fazy. Fazę niszczenia charakteryzuje zerwanie i następująca martwica włókien mięśniowych, tworzenie się krwiaka i reakcja komórek zapalnych. Podczas fazy naprawy następuje fagocytoza tkanki martwiczej, regeneracja

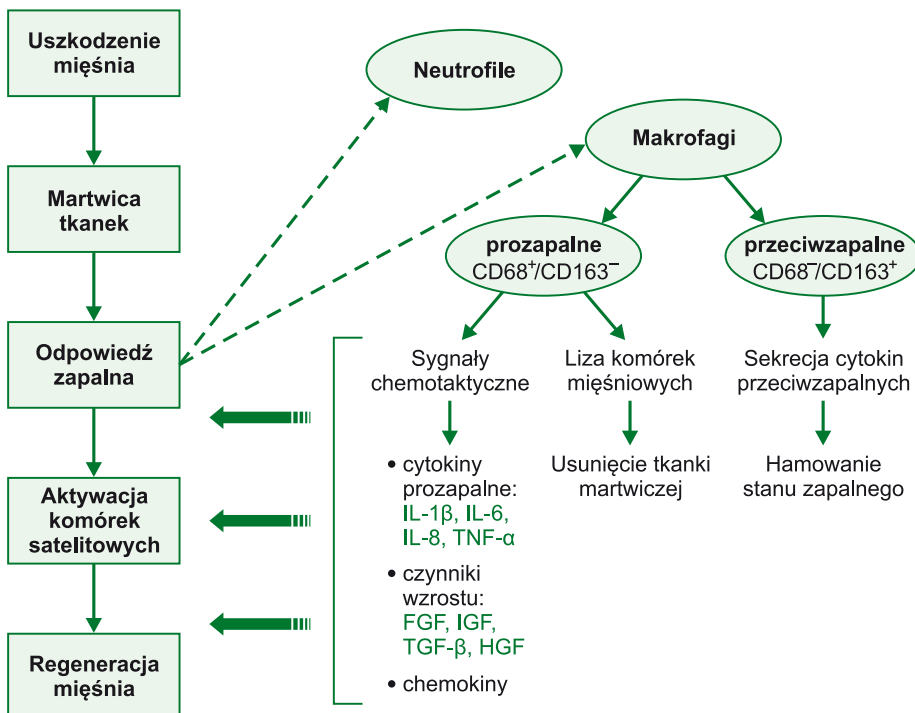
włókien mięśniowych i tworzenie blizn z tkanki łącznej, a faza przebudowy obejmuje okres, w którym dojrzewają zregenerowane włókna mięśniowe, dochodzi do obkurczenia i reorganizacji blizny oraz odzyskania sprawności mięśnia (28).

Faza niszczenia i stan zapalny

Uszkodzenie lub nadwyrężenie mięśnia szkieletowego doprowadza do martwicy tkanki, po której następuje kilkietapowa infiltracja komórkowa w obrębie urazu, charakteryzująca się wczesną inwazją neutrofilów i stopniowym naciekiem makrofagów (60). Makrofagi można podzielić na dwie odrębne populacje (7). Wcześniej pojawiające się komórki, wykazujące ekspresję markera powierzchniowego CD68 i brak ekspresji markera CD163, osiągają najwyższe stężenie 24 godziny po uszkodzeniu, a następnie ich liczba gwałtownie spada. Te makrofagi „prozapalne” wytwarzają sygnały chemotaktyczne (cytokiny prozapalne, czynniki wzrostu i chemokiny) przyciągające krążące komórki zapalne (60). Są one także odpowiedzialne za lizę uszkodzonych komórek mięśniowych i fagocytosę tkanki martwiczej. Ich właściwości cytolityczne pobudzają obecność neutrofilów (58). Druga populacja makrofagów „przeciwzapalnych” CD68⁺/CD163⁻, wywodząca się z makrofagów „prozapalnych” poprzez zmianę ich fenotypu, osiąga najwyższe stężenie w 2-4 dni po uszkodzeniu mięśnia. Wydzielają one cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-10, które przyczyniają się do zahamowania stanu zapalnego. Zdarzenia te świadczą o roli makrofagów w regulacji odpowiedzi mięśni

na uszkodzenie nie tylko poprzez usuwanie tkanki martwiczej, ale także poprzez pobudzanie regeneracji mięśni (ryc. 1).

Cytokiny prozapalne, takie jak interleukina-1 β , IL-6, IL-8, czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), mają istotne znaczenie w modulowaniu chemotaksji do uszkodzonych mięśni (60). Mogą one również stymulować ścieżki sygnałowe biorące udział w aktywacji oksydazy NADPH odpowiedzialnej za „wybuch tlenowy” i uwalnianie reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS) (4). ROS powstają podczas metabolizmu tlenowego komórek i są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesów komórkowych, takich jak: proliferacja, agregacja, chemotaksja i apoptoza, a także regulują różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe (44). Wydaje się prawdopodobne, że ROS produkowane zarówno przez neutrofile, jak i makrofagi podczas uszkodzenia mięśni wywołują oksydacyjną modyfikację białek mięśniowych: kinazy kreatynowej (CK) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), jednak zakres tych potencjalnie istotnych przemian nie jest jeszcze poznany (46). ROS odgrywają także pozytywną rolę w procesie gojenia ran. Mogą one zwiększać powinowactwo czynników wzrostu (np. FGF-2) do ich receptorów, a także pobudzają ich ekspresję (51). Nadtlenek wodoru (H₂O₂) indukuje syntezę kolagenu typu I, III i IV oraz późniejsze tworzenie połączeń poprzecznych między włóknami kolagenowymi (16). ROS pośredniczą również w przekształcaniu fibroblastów w miofibroblasty, wspomagając w ten sposób proces obkurczania ran (54). Tlenek azotu (NO) odgrywa kluczową rolę w procesie angiogenezy, powodując rozszerzanie naczyń krwionośnych i pobudzając aktywację czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor – VEGF) i czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor – FGF) (68).



Ryc. 1. Udział procesów zapalnych w regeneracji mięśni szkieletowych

Objaśnienia: - - -> Stymulacja infiltracji komórek w miejsce uszkodzenia mięśnia; ■■■> Aktywacja procesu; TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α ; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β ; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów

Naprawa i przebudowa tkanki mięśniowej

Proces naprawy jest opóźniony względem fazy zapalnej i zaczyna się około 2 dni po uszkodzeniu. Najważniejszymi komórkami zaangażowanymi w regenerację mięśni szkieletowych są komórki satelitowe – jednojądrzaste, nieaktywne komórki zahamowane w fazie G0 cyklu komórkowego, stanowiące niewielki odsetek jąder komórkowych w tkance mięśniowej. W dojrzałym mięśniu są one umiejscowione pomiędzy blaszką podstawną a sarkolemmą i ulegają aktywacji w odpowiedzi na uraz mięśnia

szkieletowego (49). Aktywacja komórek satelitowych jest ograniczona do obszarów, w których dochodzi do martwicy włókien mięśniowych i może trwać do 9-10 dni, w zależności od stopnia uszkodzenia tkanki (22). Mechanizmy związane z procesem aktywacji komórek satelitowych w odpowiedzi na uszkodzenie mięśnia nie zostały jeszcze wyjaśnione: część naukowców uważa, że ich aktywację wywołuje zaburzenie integralności sarkolemy i blaszki podstawnej (18). Inni utrzymują, że za proces ten są odpowiedzialne cytokiny uwalniane przez infiltrujące komórki zapalne (27).

Podczas uszkodzenia włókien mięśniowych dochodzi do inwazji makrofagów w miejscu urazu. Prowadzą one fagocytozę martwiczej tkanki i uwalniają czynniki wzrostu, działające mitogenicznie na komórki satelitowe, takie jak: FGF, insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor – IGF), transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β – TGF- β), czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor – HGF) i IL-6 (54). W pierwszym cyklu komórki satelitowe wchodzi w pośredni etap progenitorowy i są nazywane miogennymi komórkami prekursorowymi lub progenitorowymi (49). W ciągu godzin następujących po aktywacji komórki satelitowe wykazują ekspresję wczesnych miogennych czynników regulatorowych (MRF), takich jak MyoD i Myf5 oraz przekształcają się w silnie proliferujące komórki zwane mioblastami. W dniach następujących po aktywacji proliferujące mioblasty wykazują ekspresję białka hamującego cykl komórkowy p21 i późnych czynników MRF (miogeniny i MRF4), co powoduje wycofanie mioblastów z cyklu komórkowego i zapoczątkowanie końcowego różnicowania, w wyniku którego formowane są wielojądrowe miotuby (6). Efektem końcowym programu różnicowania jest połączenie miotub ze sobą lub z istniejącymi włóknami mięśniowymi. Okazuje się, że źródłem czynników wzrostu i cytokin, kluczowych dla procesów naprawczych mięśni szkieletowych są, oprócz naciekających komórek zapalnych, same mioblasty (20). Badanie profilu transkryptomicznego mioblastów mysich poddanych *in vitro* działaniu interferonu γ (IFN- γ) wykazało nasiloną ekspresję czynników wzrostu, takich jak: HGF, FGF7, Figf, Csf1, Vegf, Ctgf, IL-15 oraz spadek ekspresji TGF- β i IGF-I (25). Co ciekawe, IL-6, która bierze udział w degradacji białek i degeneracji mięśni (61), może wywoływać proliferację komórek satelitowych i regenerację tkanki mięśniowej (5), co potwierdza przypuszczenia, że cytokina ta jest zaangażowana w etap przejściowy od ostrego zapalenia do naprawy (31). Inne cytokiny prozapalne, TNF- α i IL-1 β , stymulują wczesne etapy miogenezy, takie jak: fuzja mioblastów, tworzenie aktywnych kompleksów receptorów integrynowych i synteza metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (21, 66), co może sprzyjać oddziaływaniom komórka–macierz, adhezji komórkowej i naprawie uszkodzonych włókien mięśniowych poprzez włączenie jąder komórek satelitowych. Wymienione efekty

wywołuje w mioblastach również IGF-I (24), co sugeruje, że cytokiny prozapalne i anaboliczne czynniki wzrostu dla mięśni wykazują podobne działanie na wczesnych etapach miogenezy.

Dalszy przebieg procesów naprawczych mięśnia może być różny w zależności od typu uszkodzenia, zaangażowania naczyń krwionośnych i tworzenia połączeń nerwowo-mięśniowych. Decydującym czynnikiem dla poprawnej regeneracji mięśni jest zachowanie blaszki podstawnej włókien mięśniowych. W procesie regeneracji mięśni może dochodzić do zróżnicowanej reorganizacji tkanki mięśniowej (10). Regenerujące miotuby w obrębie jednej blaszki podstawnej mogą się nie połączyć, co prowadzi do powstania grupy mniejszych włókien, może również dojść do niepełnej fuzji nowo powstałych miotub i utworzenia rozwidlonych włókien. Po częściowej nekrozie odtworzenie integralności włókien mięśniowych może być niemożliwe z powodu blizny oddzielającej dwa „pnie” włókien, co prowadzi do wytworzenia nowych połączeń mięśniowo-ścięgnistych. Ponadto, regenerujące włókna mięśniowe mogą powstawać poza blaszką podstawną w wyniku migracji komórek satelitowych lub przy udziale niemięśniowych komórek macierzystych, co jednak zdarza się rzadko (50).

Faza zwłóknienia mięśni szkieletowych

Tworzenie zwłókniałej blizny może prowadzić do niewłaściwego gojenia uszkodzeń i upośledzenia funkcji mięśni. Zwłóknienie mięśni jest wynikiem nagromadzenia składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces ten rozpoczyna się ok. 2 tygodnie po urazie i trwa 4 kolejne tygodnie. Gojenie się mięśni szkieletowych po urazach może być rozumiane jako równowaga pomiędzy zwłóknieniem a regeneracją. Czynniki wpływającymi na tę równowagę są: stan zapalny, czynniki wzrostu i cytokiny obecne w miejscu uszkodzenia oraz interakcje między infiltrującymi komórkami zapalnymi i komórkami miogennymi (26). Podczas tego procesu dominującymi komórkami są fibroblasty. Ważną rolę odgrywają również białka, takie jak kolagen (przeważnie typu I i III), glikoproteiny i proteoglikany. W trakcie naprawy tkanek fibroblasty wydzielają cytokiny prozapalne, takie jak IL-6 i IL-1 oraz produkują IL-8 w celu rekrutacji dodatkowych neutrofilów. Fibroblasty mogą podtrzymywać przewlekłą odpowiedź zapalną poprzez uwalnianie PGE2 w odpowiedzi na stres komórkowy (17).

Niektóre czynniki wzrostu, takie jak czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor – EGF), miostatyna i TGF- β 1, są uwalniane z komórek zapalnych w początkowej fazie i stymulują wytwarzanie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz hamują regenerację mięśni szkieletowych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* już 72 godziny po urazie (26). Uważa się, że czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie blizn w czasie gojenia ran oraz naprawy mięśni szkieletowych jest TGF- β (14). Zaproponowano dwa mechanizmy, poprzez które

TGF- β 1 pobudza włóknienie. Czynniki te stymulują produkcję białek macierzy, jednocześnie blokując ich degradację, a także wpływa na różnicowanie komórek miogennych w miofibroblasty, które syntetyzują kolagen typu I (36). Wiadomo, że przewlekły podwyższony poziom TGF- β w gojących się ranach prowadzi do wzmożonego odkładania kolagenu przez pobudzone fibroblasty, a akumulacja kolagenu ma zasadnicze znaczenie w postępującej utracie funkcji gojących się ścięgien (15).

Rola chemokin w regulacji miogenezy

Chemokiny są małymi białkami wydzielniczymi, o wielkości ok. 8-10 kDa, które przejawiają cechy biologiczne zarówno chemoatraktantów, jak i cytokin (64). Biorą one udział w regulacji migracji różnych typów komórek, np. leukocytów, plemników, komórek nowotworowych w trakcie tworzenia przerzutów, migracji mięśniowych komórek prekursorowych podczas miogenezy zarodkowej oraz przenikaniu makrofagów do uszkodzonej tkanki mięśniowej (33, 40, 42, 55, 67).

Mioblasty, traktowane *in vitro* IFN- γ wykazują zwiększoną ekspresję chemokin, takich jak: Ccl2, Ccl7, Ccl8, Ccl9, Cxcl1, Cxcl5, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl16 (25).

Wykorzystując hodowlę komórkową jako model miogenezy, Griffin i wsp. (23) zbadali poziom mRNA 84 chemokin i receptorów chemokin w różnicujących się komórkach mięśniowych. Ekspresja większości chemokin i ich receptorów podlegała stymulacji podczas miogenezy, a poziom badanych mRNA był najwyższy między 16. a 36. godziną inkubacji w pożywce różnicującej, czyli w czasie różnicowania i fuzji miocytów. Zidentyfikowano kilka receptorów i ligandów chemokin, o których wcześniej nie było wiadomo, że ulegają ekspresji w komórkach lub tkance mięśni szkieletowych, np. CXCL13 i jego receptor CXCR5.

Receptor chemokiny CC 2 (CCR2) jest niezbędny w procesie naprawy ostrego uszkodzenia mięśni szkieletowych. Ma on zasadnicze znaczenie dla narastania odpowiedzi zapalnej podczas regeneracji mięśni (65). W badaniach na myszach z knock-outem genowym Ccr2^{-/-} wykazano znacznie zmniejszoną infiltrację makrofagów w odpowiedzi na urazy mięśni spowodowane niedokrwieniem (12) i środkami miotoksycznymi – noteksyną i kardiotoksyną (1, 56). Zmniejszeniu reakcji zapalnej towarzyszyła osłabiona regeneracja mięśni, co sugeruje, że zapalenie mięśni jest procesem korzystnym, a hamowanie ścieżki sygnałowej CCR2 ma negatywny wpływ na naprawę uszkodzonego mięśnia (38). Mimo że brak odpowiedzi zapalnej przyczynia się do słabszej regeneracji mięśni, mechanizmy, w których niedobór CCR2 prowadzi do wadliwego przebiegu reakcji zapalnej i osłabionej regeneracji mięśni, nie są w pełni poznane. Nasuwa się pytanie, dlaczego tak wiele chemokin i ich receptorów ulega ekspresji bezpośrednio w komórkach mięśniowych podczas miogenezy *in vitro*. Jedną z teorii zakłada heterogen-

ność komórek mięśniowych (41), która powoduje, że w różnych subpopulacjach komórek mogą ulegać ekspresji pojedyncze receptory lub ligandy. Według innego poglądu, kilka różnych cząsteczek może ulegać ekspresji w każdej komórce mięśniowej, podobnie jak w układzie odpornościowym (11), przy czym ich wykorzystywanie musiałoby podlegać regulacji w przestrzeni i czasie. Alternatywnym wyjaśnieniem jest istnienie systemu nadmiarowego, pozwalającego na zastępowanie jednej pary „receptor–ligand” przez inną, w którym zakłócenie pojedynczej funkcji pary „receptor–ligand” nie miałoby poważnych skutków dla miogenezy.

Chemokiny syntetyzowane w wczesnym etapie miogenezy mogą regulować proliferację lub przeżycie mioblastów. Liczne pary receptor–chemokina kontrolują późniejsze fazy miogenezy, takie jak migracja i fuzja, ponieważ ekspresja tych cząsteczek nie osiąga wysokiego poziomu aż do czasu, gdy większość komórek stanowią ostatecznie zróżnicowane miocyty. Co ciekawe, według Griffin i wsp. (23) ekspresja tych cząsteczek była najwyższa podczas etapów miogenezy, w których miocyty stopniowo traciły zdolność do migracji. Prawdopodobnie, na późniejszych etapach miogenezy chemokiny pełnią rolę raczej w lokowaniu miocytów w prawidłowe układy przestrzenne niezbędne do wystąpienia fuzji z innymi miocytami i z powstającymi miotubami niż w działaniu zmierzającym do zwiększenia prędkości poruszania się komórek. Chemokiny wytwarzane w komórkach mięśniowych mogą wywierać nie tylko bezpośredni wpływ na miogenezę, lecz również działać parakrynnie poprzez rekrutację komórek odpornościowych, np. makrofagów, do uszkodzonych mięśni szkieletowych, co ma decydujące znaczenie dla procesu regeneracji (1).

Badania pojedynczej pary receptor–ligand, CXCR4 i SDF-1 α (CXCL12), wskazują na to, że niektóre zidentyfikowane chemokiny istotnie regulują migrację podczas miogenezy *in vitro*. Griffin i wsp. (23) wykazali, że CXCR4 ulega ekspresji zarówno w pierwotnych mysich mioblastach, jak i miocytach, a jego ligand SDF-1 α zwiększa migrację obu typów komórek. Ponadto, utrata CXCR4 prowadziła do zahamowania różnicowania, o czym świadczyła zmniejszona ekspresja swoistych białek mięśniowych, takich jak mio-genina i ciężki łańcuch miozyny. Co ciekawe, utrata CD164, sialomucyny, która oddziałuje z CXCR4 na powierzchni komórki, gdzie prawdopodobnie pełni funkcję elementu kompleksu receptorowego CXCR4 (2), także wpływała na migrację i tworzenie miotub, ale nie na różnicowanie komórek C2C12. Większość badań, które analizują działanie CXCR4 podczas miogenezy zarodkowej u myszy, danio pręgowanego i kurcząt wskazuje na to, że zaburzenie ścieżki sygnałowej CXCR4 modyfikuje rozwój mięśni kończyn głównie w wyniku braku migracji miogennych komórek prekursorowych z somitów do zawiązków kończyn (8, 63, 67).

Urazy i choroby oraz intensywny wysiłek fizyczny mogą prowadzić do uszkodzenia tkanki mięśniowej. Niezależnie od przyczyny i rodzaju uszkodzenia, mechanizmy naprawcze mają podobny przebieg: uszkodzone włókna mięśniowe ulegają degeneracji, której towarzyszy proces zapalny, po czym następuje regeneracja. W tej fazie komórki satelitowe proliferują i różnicują się w mioblasty oraz podlegają fuzji z uszkodzonymi włóknami mięśniowymi. Uszkodzenie błony podstawnej powoduje formowanie się łącznotkankowej blizny z fibryny i fibronektyny, co ma na celu wzmocnienie gojącego się mięśnia, jednak w przypadku powtarzających się uszkodzeń i intensywnych procesów naprawczych oraz nadmiernego namnażania się fibroblastów powstające blizny mogą osłabiać procesy naprawy i pełne odzyskanie funkcji tkanki (62). Ostateczna regeneracja zależy zatem od rodzaju urazu, przebiegu odpowiedzi zapalnej i równowagi pomiędzy procesami przebudowy i zwłóknienia tkanki. Poznanie roli humoralnych mediatorów zapalenia i regeneracji może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych, ograniczających proces zwłóknienia i umożliwiających przywrócenie mięśniom ich funkcji (17).

Wyniki badań dowodzą, że komórki satelitowe wszczepione do mięśni szkieletowych mogą zwiększyć potencjał regeneracyjny mięśni, chociaż mechanizmy warunkujące ekspansję tych komórek w uszkodzonym mięśniu nie są w pełni poznane. Zrozumienie miejscowych mechanizmów kontrolujących miogenezę regeneracyjną stwarza perspektywę do opracowania skutecznych strategii w zakresie rehabilitacji ruchowej, przywracania sprawności mięśni, regeneracji tkanek po zabiegach chirurgicznych i zapobiegania przyszłym uszkodzeniom (39). Odkrycie substancji bioaktywnych modyfikujących swoiście mechanizmy kontrolujące migrację, odnowę i różnicowanie komórek satelitowych i ich wykorzystanie do produkcji leków/preparatów może uutorować drogę nowym strategiom terapeutycznym w chorobach mięśni u człowieka, zwierząt towarzyszących i gospodarskich.

Piśmiennictwo

- Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R. K., Chazaud B.: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 2007, 204, 1057-1069.
- Bae G. U., Gaio U., Yang Y. J., Lee H. J., Kang J. S., Krauss R. S.: Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 8301-8309.
- Baroncelli A. B., Abellonio F., Pagano T. B., Esposito I., Peirone B., Papparella S., Paciello O.: Muscular dystrophy in a dog resembling human becker muscular dystrophy. *J. Comp. Pathol.* 2014, 150, 429-433.
- Butterfield T. A., Best T. M., Merrick M. A.: The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J. Athl. Train.* 2006, 41, 457-465.
- Cantini M., Massimino M. L., Rapizzi E., Rossini K., Catani C., Dalla Libera L., Carraro U.: Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 216, 49-53.
- Chargé S. B., Rudnicki M. A.: Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004, 84, 209-238.
- Chazaud B., Brigitte M., Yacoub-Youssef H., Arnold L., Gherardi R., Sonnet C., Lafuste P., Chretien F.: Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2009, 37, 18-22.
- Chong S. W., Nguyet L. M., Jiang Y. J., Korzh V.: The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 2007, 7, 54.
- Chung K. Y., Johnson B. J.: Application of cellular mechanisms to growth and development of food producing animals. *J. Anim. Sci.* 2008, 86, E226-E235.
- Ciciliot S., Schiaffino S.: Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr. Pharm. Des.* 2010, 16, 906-914.
- Civate M., Bartoli C., Schleinitz N., Chetaille B., Pellissier J. F., Figarella-Branger D.: Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2005, 31, 70-79.
- Contreras-Shannon V., Ochoa O., Reyes-Reyna S. M., Sun D., Michalek J. E., Kuziel W. A., McManus L. M., Shireman P. K.: Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2^{-/-} mice following ischemic injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, 292, C953-C967.
- Cowan J., Macdessi J., Stark A., Morgan G.: Incidence of Duchenne muscular dystrophy in New South Wales and Australian Capital Territory. *J. Med. Genet.* 1980, 17, 245-249.
- Cutroneo K. R.: TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair Regen.* 2007, 15, S54-S60.
- Darmani H., Crossan J., McLellan S. D., Meek D., Adam C.: Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium. *Mediators Inflamm.* 2004, 13, 299-305.
- Elgawish A., Glomb M., Friedlander M., Monnier V. M.: Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 12964-12971.
- Filippin L. I., Moreira A. J., Marroni N. P., Xavier R. M.: Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide.* 2009, 21, 157-163.
- Fu X., Wang H., Hu P.: Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol. Life Sci.* 2015, 72, 1663-1677.
- Gaiad T. P., Araujo K. P., Serrão J. C., Miglino M. A., Ambrósio C. E.: Motor physical therapy affects muscle collagen type I and decreases gait speed in dystrophin-deficient dogs. *PLoS One.* 2014, 9, e93500.
- Ge Y., Waldemer R. J., Nalluri R., Nuzzi P. D., Chen J.: RNAi screen reveals potentially novel role of cytokines in myoblast differentiation. *PLoS One.* 2013, 8, e68068.
- Grabiec K., Tokarska J., Milewska M., Błaszczak M., Gajewska M., Grzelkowska-Kowalczyk K.: Interleukin-1beta stimulates early myogenesis of mouse C2C12 myoblasts: the impact on myogenic regulatory factors, extracellular matrix components, IGF binding proteins and protein kinases. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013, 16, 255-264.
- Grefte S., Kuijpers-Jagtman A. M., Torensma R., Von den Hoff J. W.: Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007, 16, 857-868.
- Griffin C. A., Apponi L. H., Long K. K., Pavlath G. K.: Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J. Cell Sci.* 2010, 123, 3052-3060.
- Grzelkowska-Kowalczyk K., Grabiec K., Tokarska J., Gajewska M., Błaszczak M., Milewska M.: Insulin-like growth factor-I increases laminin, integrin subunits and metalloprotease ADAM12 in mouse myoblasts. *Folia Biol.-Krakow* 2015, 63, 241-247.
- Grzelkowska-Kowalczyk K., Wicik Z., Majewska A., Tokarska J., Grabiec K., Kozłowski M., Milewska M., Błaszczak M.: Transcriptional regulation of important cellular processes in skeletal myogenesis through interferon- γ . *J. Interferon Cytokine Res.* 2015, 35, 89-99.
- Huard J., Gates C.: Management of skeletal muscle injuries in military personnel. *Oper. Tech. Sports Med.* 2005, 13, 247-256.
- Huard J., Li Y., Fu F. H.: Muscle injuries and repair: current trends in research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2002, 84-A, 822-832.
- Järvinen T. A., Järvinen M., Kalimo H.: Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014, 3, 337-345.
- Johnson B. J., Halstead N., White M. E., Hathaway M. R., DiCostanzo A., Dayton W. R.: Activation state of muscle satellite cells isolated from steers implanted with a combined trenbolone acetate and estradiol implant. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 2779-2786.
- Kamanga-Sollo E., Pampusch M. S., Xi G., White M. E., Hathaway M. R., Dayton W. R.: IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. *J. Cell. Physiol.* 2004, 201, 181-189.
- Kaplanski G., Marin V., Montero-Julian F., Mantovani A., Farnarier C.: IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003, 24, 25-29.
- Karalaki M., Fili S., Philippou A., Koutsilieris M.: Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 2009, 23, 779-796.
- Kim C. H.: The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr. Opin. Hematol.* 2005, 12, 298-304.

34. Kornegay J. N., Bogan J. R., Bogan D. J., Childers M. K., Li J., Nghiem P., Detwiler D. A., Larsen C. A., Grange R. W., Bhavaraju-Sanka R. K., Tou S., Keene B. P., Howard J. F. Jr, Wang J., Fan Z., Schatzberg S. J., Styner M. A., Flanigan K. M., Xiao X., Hoffman E. P.: Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm. Genome* 2012, 23, 85-108.
35. Kuttappan V. A., Shivaprasad H. L., Shaw D. P., Valentine B. A., Hargis B. M., Clark F. D., McKee S. R., Owens C. M.: Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult. Sci.* 2013, 92, 331-338.
36. Li Y., Foster W., Deasy B. M., Chan Y., Prisk V., Tang Y., Cummins J., Huard J.: Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1007-1019.
37. Lobleby G. E., Milne V., Lovie J. M., Reeds P. J., Pennie K.: Whole body and tissue protein synthesis in cattle. *Br. J. Nutr.* 1980, 43, 491-502.
38. Lu H., Huang D., Saederup N., Charo I. F., Ransohoff R. M., Zhou L.: Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J.* 2011, 25, 358-369.
39. Marcellin-Little D. J., Levine D.: Principles and application of range of motion and stretching in companion animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2015, 45, 57-72.
40. Miyazaki H., Patel V., Wang H., Edmunds R. K., Gutkind J. S., Yeudall W. A.: Down-regulation of CXCL5 inhibits squamous carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006, 66, 4279-4284.
41. Motohashi N., Uezumi A., Yada E., Fukada S., Fukushima K., Imaizumi K., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S.: Muscle CD31(-)CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am. J. Pathol.* 2008, 173, 781-791.
42. Nicholas J., Voss J. G., Tsuji J., Fulkerson N. D., Soulkova J., Schneider B. S.: Time course of chemokine expression and leukocyte infiltration after acute skeletal muscle injury in mice. *Innate. Immun.* 2015, 21, 266-274.
43. Nishimura D., Sakai H., Sato T., Sato F., Nishimura S., Toyama-Sorimachi N., Bartsch J. W., Sehara-Fujisawa A.: Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. *Mech. Dev.* 2015, 135, 58-67.
44. Oktyabrsky O. N., Smirnova G. V.: Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc.)* 2007, 72, 132-145.
45. Petracchi M., Cavani C.: Muscle growth and poultry meat quality issues. *Nutrients* 2012, 4, 1-12.
46. Pierce A. P., de Waal E., McManus L. M., Shireman P. K., Chaudhuri A. R.: Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 43, 1584-1593.
47. Prior T. W., Bridgeman S. J.: Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Diagn.* 2005, 7, 317-326.
48. Rovere R. M. La, Quattrocchi M., Pietrangelo T., Di Filippo E. S., Macca-trozzi L., Cassano M., Mascarello F., Barthélémy I., Blot S., Sampaolesi M., Fulle S.: Myogenic potential of canine craniofacial satellite cells. *Front Aging Neurosci.* 2014, 6, 90.
49. Rudnicki M. A., Le Grand F., McKinnell I., Kuang S.: The molecular regulation of muscle stem cell function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2008, 73, 323-331.
50. Schmalbruch H.: The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue Cell.* 1976, 8, 673-692.
51. Sen C. K.: The general case for redox control in wound repair. *Wound Repair Regen.* 2003, 11, 431-438.
52. Sihvo H. K., Immonen K., Puolanne E.: Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet. Pathol.* 2014, 51, 619-623.
53. Smith K. R., Duckett S. K., Azain M. J., Sonon R. N. Jr, Pringle T. D.: The effect of anabolic implants on intramuscular lipid deposition in finished beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2007, 85, 430-440.
54. Soneja A., Drews M., Malinski T.: Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol. Rep.* 2005, 57, 108-119.
55. Stebler J., Spieler D., Slanchev K., Molyneaux K. A., Richter U., Cojocaru V., Tarabykin V., Wylie C., Kessel M., Raz E.: Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.* 2004, 272, 351-361.
56. Sun D., Martinez C. O., Ochoa O., Ruiz-Willhite L., Bonilla J. R., Centonze V. E., Waite L. L., Michalek J. E., McManus L. M., Shireman P. K.: Bone marrow-derived cell regulation of skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2009, 23, 382-395.
57. Tatsumi R.: Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim. Sci. J.* 2010, 81, 11-20.
58. Tidball J. G.: Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005, 288, R345-R353.
59. Tidball J. G.: Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr. Physiol.* 2011, 1, 2029-2062.
60. Toumi H., F'guyer S., Best T. M.: The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J. Anat.* 2006, 208, 459-470.
61. Tsujinaka T., Ebisui C., Fujita J., Kishibuchi M., Morimoto T., Ogawa A., Katsume A., Ohsugi Y., Kominami E., Monden M.: Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 207, 168-174.
62. Urso M. L.: Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *J. Appl. Physiol.* 2013, 115, 920-928.
63. Vasyutina E., Stebler J., Brand-Saberi B., Schulz S., Raz E., Birchmeier C.: CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev.* 2005, 19, 2187-2198.
64. Viola A., Luster A. D.: Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008, 48, 171-197.
65. Warren G. L., Hulderman T., Mishra D., Gao X., Millecchia L., O'Farrell L., Kuziel W. A., Simeonova P. P.: Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2005, 19, 413-415.
66. Wieteska-Skrzeczyńska W., Grzelkowska-Kowalczyk K., Tokarska J., Grabiec K.: Growth factor and cytokine interactions in myogenesis. Part I. The effect of TNF-alpha and IFN-gamma on IGF-I-dependent differentiation in mouse C2C12 myogenic cells. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011, 14, 417-424.
67. Yusuf F., Rehim R., Moroşan-Puopolo G., Dai F., Zhang X., Brand-Saberi B.: Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos. *Dev. Dyn.* 2006, 235, 3007-3015.
68. Ziche M., Morbidelli L.: Nitric oxide and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 2000, 50, 139-148.

Adres autora: mgr Marta Milewska, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: mamill@o2.pl