

UDZIAŁ NIEMIĘŚNIOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH W REGENERACJI MIĘŚNI SZKIELETOWYCH*

PARTICIPATION OF 'NON-MUSCLE' STEM CELLS
IN REGENERATION OF SKELETAL MUSCLE

Karolina ARCHACKA, Jerzy MORACZEWSKI, Iwona GRABOWSKA

Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Mięśnie szkieletowe są zdolne do regeneracji w odpowiedzi na uszkodzenie będące wynikiem na przykład urazu mechanicznego, działania toksyny lub choroby. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają komórki satelitowe zlokalizowane w mięśniu szkieletowym. Jednak zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i eksperymentalnych w regenerację mogą zostać zaangażowane komórki macierzyste rezydujące w mięśniu lub pochodzące z innego źródła. Budzi to nadzieje na potencjalne wykorzystanie tych komórek w terapii chorób mięśni szkieletowych, takich jak dystrofie mięśniowe czy rdzeniowy zanik mięśni. U pacjentów cierpiących na te choroby obserwuje się zaburzenia regeneracji mięśni, często powiązane z wyczerpaniem lub zmniejszeniem endogennej populacji komórek satelitowych. Dlatego wykorzystanie komórek macierzystych mogłoby spowodować przywrócenie możliwości odbudowy mięśni szkieletowych. Jednak taka terapia będzie możliwa dopiero po przeprowadzeniu precyzyjnej analizy właściwości komórek macierzystych, której kluczowym elementem jest ocena ich potencjału miogenicznego, czyli zdolności do różnicowania w komórki i włókna mięśniowe. Niniejsza praca podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat potencjału miogenicznego różnych populacji komórek macierzystych i wskazuje te z nich, które mają szansę stać się źródłem komórek przeszczepianych podczas terapii chorób mięśni szkieletowych.

Słowa kluczowe: mięśnie szkieletowe, regeneracja, komórki macierzyste, transplantacja, potencjał miogeniczny.

Summary: Skeletal muscle tissue is characterized by ability to regenerate in response to injury resulting for example from mechanical trauma, toxin or disease. The key role in this process is played by satellite cells localized in skeletal muscle. However, both under physiological and experimental conditions different types of stem cells originating either from skeletal muscle or other tissues can be also involved in regeneration. This raises the hope for potential use of stem cells in the therapy for skeletal muscles diseases, such as muscular dystrophies or spinal muscle atrophy. These pathologies are characterized by impairment of regeneration linked with depletion or reduction of endogenous population of satellite cells. Thus, transplantation of stem cells could improve regeneration of such muscle and, as a result, support their reconstruction. However, stem cells based therapy will be possible only after precise analysis of

*Artykuł powstał podczas realizacji projektów badawczych finansowanych ze środków na naukę MNiSW nr: N301 4051 33 i N303 3081 33.

their features, especially their myogenic potential, i.e. the ability to differentiate into muscle cells and fibers. This review summarizes current state of knowledge concerning myogenic potential of different types of stem cells and indicates those that are likely to be used in a future as a source of cells transplanted during skeletal muscle therapy.

Keywords: skeletal muscles, regeneration, stem cells, transplantation, myogenic potential.

1. WPROWADZENIE

Mięśnie szkieletowe są zdolne do regeneracji w odpowiedzi na uszkodzenie mechaniczne (intensywny wysiłek fizyczny, zmiżdżenie, rozerwanie), chemiczne (działanie toksyn) oraz termiczne (działanie wysokiej lub niskiej temperatury). Również podczas rozwoju choroby wywołanej np. nieprawidłowym unerwieniem mięśni lub brakiem istotnych białek strukturalnych w mięśniach szkieletowych indukowana jest regeneracja. Podstawową rolę w regeneracji odgrywają komórki prekursorowe mięśni szkieletowych – komórki satelitowe. Komórki satelitowe zlokalizowane są w niszy pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną włókna mięśniowego i w warunkach fizjologicznych pozostają nieaktywne mitotycznie. Szacuje się, że u myszy wkrótce po urodzeniu jądra komórek satelitowych stanowią około 30% wszystkich jąder obecnych w mięśniach szkieletowych. Wraz z wiekiem ich liczba znacząco się zmniejsza, co wpływa na ograniczenie zdolności mięśni szkieletowych do regeneracji [68].

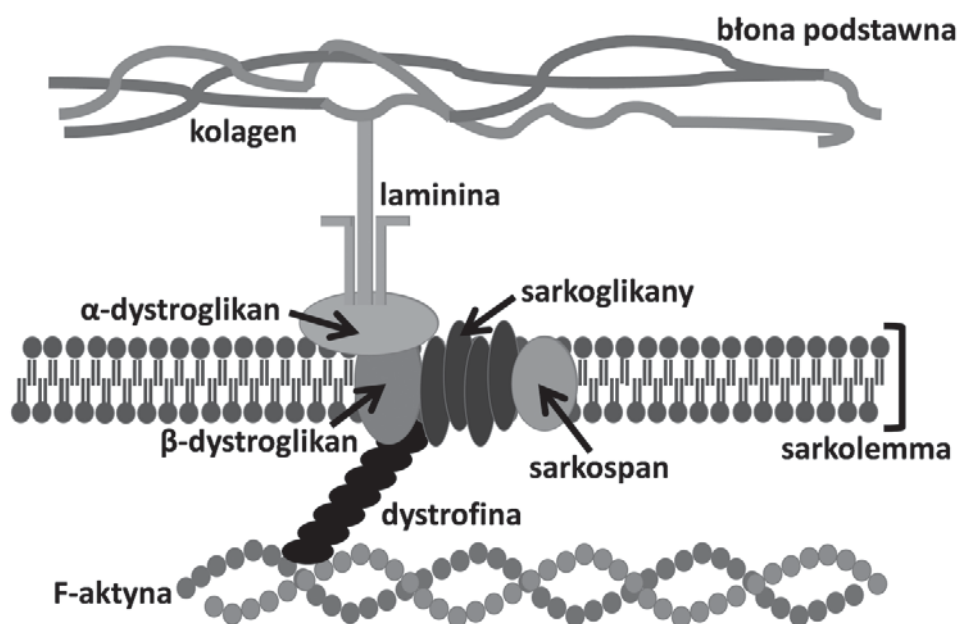
Komórki satelitowe syntetyzują wiele charakterystycznych dla nich czynników, takich jak: białka transbłonowe M-kadheryna (cząsteczka adhezyjna zależna od jonów wapnia), c-Met (receptor dla hepatocytowego czynnika wzrostu), CD34 (marker hematopoetycznych komórek macierzystych) oraz czynniki transkrypcyjne Pax7 i Myf-5 [69]. Najważniejsze z wymienionych czynników – białko Pax7 – jest kluczowe dla powstania odpowiednio dużej puli komórek satelitowych. U myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *pax7* liczba komórek satelitowych jest znacznie mniejsza niż u myszy typu dzikiego, co powoduje zaburzenia procesu regeneracji [45]. Po uszkodzeniu mięśnia lub w trakcie rozwoju choroby, komórki satelitowe ulegają aktywacji, zaczynają się intensywnie dzielić, a następnie różnicować w mioblasty. Następnie mioblasty w wyniku fuzji albo są włączane do istniejących włókien mięśniowych, albo tworzą *de novo* wielojądrowe miotuby i włókna mięśniowe, co prowadzi do odtworzenia struktury regenerującego mięśnia. W zaktywowanych, różnicujących komórkach dochodzi do sekwencyjnej syntezy mięśniowych czynników regulatorowych – MRF (ang. *myogenic regulatory factors*, do rodziny tej należą MyoD, Myf-5, Mrf-4 oraz miogenina). W części populacji aktywowanych komórek satelitowych rozpoczyna się ekspresja genu *myoD*, natomiast stopniowo zanika ekspresja *pax7*. Uruchamia to kaskadę sygnałów prowadzących do różnicowania tych komórek w mioblasty. Kolejnym etapem różnicowania jest fuzja mioblastów i utworzenie przez nie wielojądrowych miotub, a następnie dojrzewanie powstałych włókien mięśniowych. Procesom tym towarzyszy ekspresja *mrf4* i *miogeniny* – czynników transkrypcyjnych zaliczanych do tzw. „późnych” MRF. W

pozostałych komórkach satelitowych nie dochodzi do ekspresji *myoD*, dzięki czemu syntetyzują one nadal białko Pax7, pozostają w stanie niezróżnicowanym i odtwarzają pulę komórek satelitowych [68]. Z komórek satelitowych związanych z jednym włóknem mięśniowym może powstać ponad sto nowych włókien zawierających tysiące jąder. Ponadto, ponieważ komórki satelitarne charakteryzuje zdolność do samoodnawiania populacji, proces ten może być wielokrotnie powtarzany [16].

2. PIERWSZE PRÓBY TERAPII DYSFUNKCJONALNYCH MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Regeneracja mięśni szkieletowych nie zawsze przebiega w sposób prawidłowy. U pacjentów cierpiących na choroby mięśni, takie jak dystrofie mięśniowe czy rdzeniowy zanik mięśni, obserwuje się poważne zaburzenia tego procesu [26, 37]. Najpowszechniejszą grupą chorób mięśni są dystrofie mięśniowe, w tym występująca u 1 na 3500 urodzonych chłopców dystrofia mięśniowa Duchenne'a [3]. Dystrofie mięśniowe stanowią grupę ponad 30 chorób genetycznych, objawiających się stopniowym osłabieniem i zanikiem mięśni szkieletowych. We wczesnej fazie choroby w mięśniach zachodzą na zmianę fazy degeneracji i regeneracji, które prowadzą do wyczerpania puli komórek satelitowych. W efekcie mięsień nieprawidłowo regeneruje, dochodzi w nim do rozwoju fibrozy (zwłóknienia), która zaburza strukturę i funkcję mięśni [26]. Opisane zmiany patologiczne mogą prowadzić do niepełnosprawności ruchowej i często do śmierci na skutek niewydolności oddechowej. Do chwili obecnej nie została opracowana skuteczna terapia najcięższych dystrofii mięśniowych oraz wielu innych chorób neuromięśniowych. Wyniki prowadzonych w ostatnich latach badań świadczą, że wykorzystanie komórek macierzystych w terapii tych chorób może dać satysfakcjonujące rezultaty [46, 47].

Podstawową rolę w regeneracji mięśni szkieletowych odgrywają komórki satelitarne, dlatego też są one komórkami „pierwszego wyboru” w terapiach komórkowych mających na celu leczenie lub łagodzenie objawów chorób mięśni szkieletowych. Pionierskie doświadczenia z wykorzystaniem komórek satelitowych lub powstałych z nich, w wyniku różnicowania, mioblastów przeprowadzono na przełomie lat 80. i 90. W 1989 roku Partridge i współpracownicy wprowadzili mioblasty linii komórkowej C2C12 do mięśni myszy *mdx*, stanowiących zwierzęcy model dystrofii [46, 47]. Myszy *mdx* charakteryzuje mutacja w genie kodującym dystrofinę, jedno z białek strukturalnych, którego obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania mięśni szkieletowych [3]. Dystrofina zapewnia swoiste połączenie pomiędzy F-aktyną wchodzącą w skład cytoszkieletu włókna mięśniowego a kompleksem glikoproteinowym DAG (ang. *dystrophin-associated glycoprotein complex*) zlokalizowanym w jego sarkolemmie (ryc. 1). Kompleks DAG zbudowany jest z sarkoglikanów i dystroglikanów odpowiedzialnych z kolei za wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, np. lamininy. Dystrofina, tworząc połączenie pomiędzy cytoszkieletem a macierzą zewnątrzkomórkową stabilizuje błonę włókna mięśniowego podczas



RYCINA 1. Oddziaływania dystrofiny z innymi białkami strukturalnymi we włóknie mięśniowym. Dystrofina zlokalizowana jest w cytoplazmie włókna mięśniowego, gdzie odpowiada za połączenie z F-aktyną, białkiem cytoszkieletu, a także z kompleksem glikoproteinowym obecnym w sarkolemmie. Kompleks ten składa się z licznych białek transbłonowych, m.in. z sarkoglikanów i sarkospanu o nieznanych funkcjach, a także dystroglikanów odpowiedzialnych za wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, np. lamininy. Laminina między innymi wraz z kolagenem tworzy błonę podstawną otaczającą włókno mięśniowe

FIGURE 1. Interactions of dystrophin with other structural proteins in a skeletal fiber: Dystrophin is localized in the cytoplasm of a skeletal fiber, where it forms links both with F-actin, a cytoskeletal protein, and the glycoprotein complex present in the sarcolemma. The complex includes many transmembrane proteins like sarcoglycans and sarcospan, not described functionally yet, as well as dystroglycans that bind proteins of the extracellular matrix, for example laminin. Laminin together with collagen are the major proteins of the basal lamina surrounding the muscle fiber

skurczu mięśnia. Ponadto pośredniczy w przekazywaniu siły generowanej w kurczących się sarkomerach, podstawowych jednostkach strukturalno-czynnościowych mięśni szkieletowych, do macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie do ścięgien [3]. Nieobecność dystrofiny w mięśniu szkieletowym prowadzi więc do obniżenia siły jego skurczu, a także do ciągłego uszkodzania błony włókien mięśniowych podczas kolejnych skurczów.

W doświadczeniach przeprowadzonych przez Partridge'a i współpracowników zaobserwowano wznowienie syntezy dystrofiny w mięśniach szkieletowych myszy *mdx* po transplantacji mioblastów linii C2C12. Świadczyło to o tym, że wprowadzone komórki były zdolne do zasiedlenia dystroficznego mięśnia i tworzenia prawidłowo funkcjonujących włókien mięśniowych. Te i podobne doświadczenia zapoczątkowały w latach 90. „lawinę” badań klinicznych, podczas których wstrzykiwano „zdrowe” mioblasty do mięśni szkieletowych pacjentów cierpiących na dystrofię. Próby te jednak zakończyły się niepowodzeniem. Obserwowano bardzo wysoką śmiertelność transplantowanych komórek (około 75% z nich ginęło wkrótce po transplantacji), ich niewielką migrację w mięśniu oraz, dodatkowo, eliminację wprowadzonych

komórek na skutek odpowiedzi immunologicznej chorego [46, 47]. Zastosowanie leków immunosupresyjnych oraz modyfikacja metod wprowadzania mioblastów do mięśni (np. przez wykorzystanie trójwymiarowych „rusztowań” dla komórek, podawanie wraz z komórkami czynników wzrostu i białek macierzy zewnątrz-komórkowej) pozwoliło w ostatnich latach osiągnąć lepsze wyniki (wyższa przeżywalność transplantowanych komórek, lepsza migracja komórek w mięśniu). Ciągłe jednak nie doprowadzono do znaczącej poprawy funkcjonowania mięśnia, co nie pozwala myśleć o stosowaniu tej terapii w leczeniu chorób mięśni [60].

Standardowe metody izolacji komórek satelitowych z mięśni szkieletowych i ich późniejsza hodowla *in vitro* prowadzą do różnicowania w mioblasty, a przez to niestety do obniżenia ich „potencjału regeneracyjnego” [42]. Pierwsze doświadczenia polegające na wprowadzeniu do mięśni szkieletowych nieodróżnicowanych komórek satelitowych przeprowadzono dopiero w ostatnich latach. W doświadczeniach tych transplutowano całe włókna mięśniowe razem z obecnymi w nich komórkami satelitowymi lub komórki satelitarne bezpośrednio po ich izolacji z włókien. W obu przypadkach obserwowano masową regenerację mięśni oraz poprawę ich funkcjonowania. Ponadto, przeszczepione komórki zasiedlały nisze charakterystyczne dla komórek satelitowych, co jest jednym z warunków powodzenia terapii komórkowej [12, 16, 42, 50]. Mimo obiecujących wyników, terapia z wykorzystaniem komórek satelitowych wydaje się być jednak mało realna ze względu na liczne trudności. Po pierwsze, populacja tych komórek jest ograniczona i wykorzystanie ich do transplantacji wymagałoby zwiększenia ich liczby w warunkach *in vitro*, co niestety prowadzi do utraty ich zdolności do wydajnego udziału w regeneracji [42]. Ograniczenia związane z hodowlą *in vitro* uniemożliwiają także zabiegi, które mogłyby doprowadzić do genetycznej „korekty” komórek pobranych od pacjenta cierpiącego na dystrofię mięśniową i powtórne ich wprowadzenie do organizmu chorego. Stąd też duże nadzieje wzbudza możliwość wykorzystania komórek macierzystych, które mogłyby stanowić alternatywne źródło komórek do przeszczepu.

Duże zainteresowanie możliwością wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej wiąże się z ich cechami charakterystycznymi, tj. zdolnością do samoodnawiania, która gwarantuje uzyskanie wystarczająco dużej populacji komórek do transplantacji, oraz ich zdolnością do różnicowania w wyspecjalizowane rodzaje komórek. Komórki macierzyste są obecne w organizmach na wszystkich etapach rozwoju, od rozwoju zarodkowego do dorosłości. Te wywodzące się z zarodków charakteryzują się wysokim tempem proliferacji oraz dużymi zdolnościami do różnicowania. Komórki macierzyste obecne w organizmach dorosłych zwykle mają ograniczone możliwości różnicowania i odpowiadają za uzupełnianie populacji komórek tkanki, w której rezydują, a które „zużywane” są w trakcie życia organizmu [34]. Jednak bez względu na istniejące różnice kluczową cechą wszystkich rodzajów komórek macierzystych, które mogłyby stanowić źródło materiału do przeszczepu w terapii chorób mięśni szkieletowych, musi być ich zdolność do różnicowania w komórki mięśniowe. Zdolność ta określana jest jako potencjał miogeniczny.

3. JAK OCENIĆ POTENCJAŁ MIOGENICZNY KOMÓREK MACIERZYSTYCH?

Potencjał miogeniczny komórek macierzystych można ocenić testując je zarówno w warunkach hodowli *in vitro*, jak i *in vivo*. Pozwala to na określenie, czy z komórek macierzystych powstają komórki tożsame lub przypominające pod względem właściwości komórki mięśniowe – czyli komórki satelitowe i wywodzące się z nich mioblasty, a następnie wielojądrowe miotuby i włókna mięśniowe.

a. Ocena potencjału miogenicznego komórek macierzystych *in vitro*

Poddawane ocenie komórki macierzyste porównuje się do mioblastów sprawdzając obecność, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, czynników z rodziny Pax oraz MRF, a także występowanie białek strukturalnych oraz niezbędnych do fuzji białek adhezyjnych (np. M-kadheryny, syndekanu-4, ciężkich łańcuchów miozyny). Kolejnym istotnym etapem weryfikacji potencjału miogenicznego komórek macierzystych jest określenie, czy sygnały płynące ze środowiska, w którym się znajdują są w stanie zaindukować ich różnicowanie w mioblasty. Proces ten można indukować stosując kilka procedur. Badane komórki mogą być hodowane w standardowych pożywkach promujących proliferację, a następnie różnicowanie komórek mięśniowych. Komórki macierzyste można hodować także w pożywce kondycjonowanej (inaczej warunkowanej) przez różnicujące komórki mięśniowe, czyli takiej, która zawiera czynniki wydzielane przez mioblasty [6, 58]. W praktyce metody te często okazują się niewystarczające do indukcji różnicowania komórek macierzystych w mioblasty. Bardziej efektywna wydaje się być hodowla mieszana (inaczej kokultura) komórek macierzystych z różnicującymi komórkami mięśniowymi. Zapewnia ona bezpośredni kontakt badanych komórek z mioblastami, dzięki czemu mają one szansę odpowiedzieć na czynniki wydzielane przez mioblasty, między innymi insulinopodobny czynnik wzrostu – IGFI i IGFII (ang. *insulin-like growth factor*) czy czynnik wzrostu fibroblastów – FGF (ang. *fibroblast growth factor*) i rozpocząć różnicowanie. Metoda ta umożliwia także określenie częstości występowania hybrydowych miotub powstałych w wyniku fuzji komórek macierzystych z mioblastami, których obecność sugeruje, że z danego typu komórek mogą powstać funkcjonalne komórki mięśniowe biorące aktywny udział w procesie regeneracji mięśni szkieletowych [56].

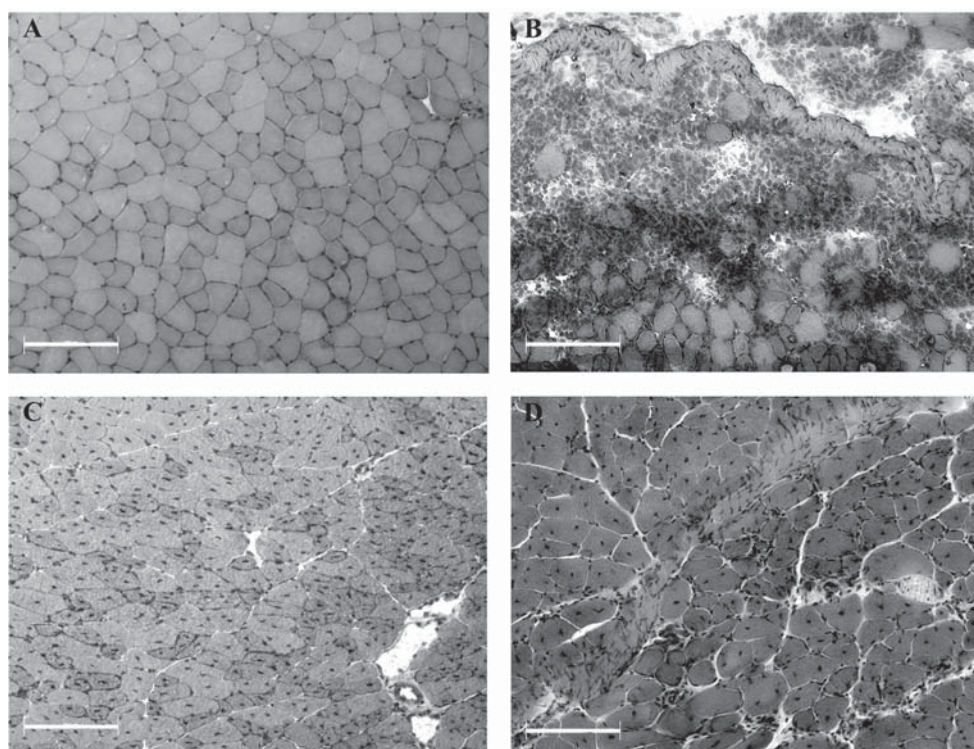
Inną strategią może być wprowadzanie do pożywki, w której hodowane są komórki macierzyste, czynników odpowiedzialnych za indukcję miogenezy podczas rozwoju zarodkowego, takich jak: białka z rodziny Wnt, białko morfogenetyczne kości BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) czy *Sonic Hedgehog*. Próba naśladowania procesów zachodzących *in vivo* jest jednak dość trudna i często wymaga zastosowania kilku czynników dodawanych do pożywki w ściśle określonym czasie i stężeniu. Dlatego popularnym sposobem testowania potencjału miogenicznego komórek macierzystych jest ich hodowla w obecności komórek wydzielających wspomniane czynniki, takich jak np. fibroblasty syntetyzujące białko Wnt7a, które podczas rozwoju zarodkowego odpowiada za indukcję miogenezy [6].

Różnicowanie niektórych komórek macierzystych można osiągnąć przez stosowanie czynników chemicznych, np. 5-azacytydyny (5-AzaC), która jest inhibitorem metylacji DNA i przez zmianę konformacji chromatyny w komórce wpływa na zmianę wzoru ekspresji określonych genów. Pod wpływem 5-AzaC wiele typów komórek, np. komórki macierzyste płynu owodniowego i mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego różnicuje w komórki mięśniowe [11, 24]. Podobny efekt można osiągnąć wprowadzając do testowanych komórek wektory kodujące określone mięśniowe czynniki regulatorowe. Taka strategia przyniosła pozytywne wyniki m.in. w przypadku zarodkowych komórek macierzystych. Przykładowo, nadekspresja białka Pax3 w tych komórkach wywołała ich różnicowanie w komórki miogeniczne [19].

b. Ocena potencjału miogenicznego komórek macierzystych *in vivo*

Ocena możliwości różnicowania komórek macierzystych w komórki mięśniowe w warunkach *in vitro* stanowi wstęp do najważniejszej części analizy, czyli weryfikacji ich potencjału miogenicznego *in vivo*. Najpopularniejszym stosowanym testem jest wprowadzanie badanych komórek do regenerujących mięśni szkieletowych zwierząt laboratoryjnych (np. myszy), a następnie kompleksowa analiza skutków tej transplantacji. Regeneracja mięśni szkieletowych może być wywołana na wiele sposobów, między innymi przez mechaniczne uszkodzenie mięśni, silne zmrożenie lub nastrzyknięcie miotoksyną (np. kardiotoksyną otrzymaną z jadu kobry). Kardiotoksyna powoduje perforację błon komórkowych i aktywację tkankowej fosfolipazy C, a w konsekwencji zaburzenia w funkcjonowaniu kanałów jonowych, które prowadzą do depolaryzacji i degradacji błon komórkowych [28]. Bez względu na sposób uszkodzenia, w mięśniu dochodzi do naruszenia integralności błony włókien mięśniowych, które stają się bardziej przepuszczalne i pozwalają na uwolnienie do surowicy czynników zlokalizowanych do tej pory w ich cytoplazmie, np. kinazy kreatyninowej. Proces regeneracji przebiega według podobnego schematu i składa się z dwóch nakładających się faz: degeneracyjnej (miolizy) oraz regeneracyjnej (rekonstrukcji). Podczas miolizy dochodzi do nekrozy uszkodzonych włókien mięśniowych, a uwalniane z nich cytokiny i czynniki wzrostu powodują rozwój stanu zapalnego w miejscu uszkodzenia. Komórki stanu zapalnego, takie jak neutrofile i makrofagi, fagocytują uszkodzone włókna mięśniowe i resztki uszkodzonej tkanki. Równocześnie w mięśniu dochodzi do aktywacji komórek satelitowych, które intensywnie proliferują, różnicują i odtwarzają włókna mięśniowe (ryc. 2) [15].

W doświadczeniach prowadzonych *in vivo* ważne jest sprawdzenie, czy wprowadzone komórki potrafią przetrwać w środowisku regenerujących mięśni, a także czy są zdolne do proliferacji i migracji w obrębie tej tkanki. Wprowadzone komórki mogą być rozpoznawane i eliminowane przez układ odpornościowy biorcy, należy więc określić, jak ich obecność w mięśniu szkieletowym wpływa na rozwój stanu zapalnego i czy nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciwko przeszczepowi, zaburzając w ten sposób przebieg regeneracji. W prowadzonych *in vivo* badaniach często wykorzystuje się myszy SCID, NOD lub Rag2^{-/-}. Zwierzęta te charakteryzuje



RYCINA 2. Regeneracja mięśni szkieletowych myszy. A – przekrój poprzeczny przez nieuszkodzony mięsień szkieletowy myszy (*m. gastrocnemius*), widoczne włókna mięśniowe z peryferyjnie położonymi jądrami komórkowymi; B – przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy myszy, 3. dzień po uszkodzeniu kardiotoksyną, widoczne uszkodzone włókna mięśniowe i liczne komórki stanu zapalnego rozwijającego się w mięśniu; C – przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy myszy, 14 dni po uszkodzeniu kardiotoksyną, widoczne nowoutworzone włókna mięśniowe z centralnie położonymi jądrami komórkowymi; D – przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy 3-miesięcznej myszy SMN, widoczne liczne włókna mięśniowe z centralnie położonymi jądrami komórkowymi powstałe w wyniku „spontanicznej” regeneracji mięśnia w odpowiedzi na nieprawidłowe unerwienie mięśnia (skrawki barwione hematoksyliną Harrisa i eozyną Y – A, B, C oraz hematoksyliną Gilla i eozyną Y – D, skala – 500 μm

FIGURE 2. Regeneration of mouse skeletal muscles: A – representative cross section of intact mouse skeletal muscle (*gastrocnemius* muscle). Muscle fibers with peripherally located nuclei are visible. B – cross section of mouse skeletal muscle 3 days after cardiotoxin injection. Damaged muscle fibers and numerous inflammatory cells are visible. C – cross section of mouse skeletal muscle 14 days after cardiotoxin treatment. Newly regenerated fibers with central nuclei are visible. D – cross section of skeletal muscle isolated from 3-month-old SMN mouse. As a result of „spontaneous” regeneration of muscle in response to improper innervation numerous muscle fibers with centrally located nuclei are visible. Sections stained with Harris' hematoxylin and eosin Y (A, B, C) or Gill's hematoxylin and eosin Y (D) Bar represents 500 μm

niedobór odporności [33, 35], a co za tym idzie nie odrzucają one przeszczepów nie tylko w układzie allogenicznym (od osobników tego samego gatunku), ale także w układzie ksenogenicznym (od osobników innych gatunków). Wykorzystanie tych zwierząt pozwala więc na testowanie udziału np. ludzkich komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych. Najważniejszym etapem analizy właściwości

wprowadzonych do mięśnia komórek macierzystych jest określenie, czy komórki te różnicują w mioblasty, czy podczas regeneracji biorą udział w tworzeniu hybrydowych włókien mięśniowych i czy są zdolne do zasiedlenia niszy charakterystycznej dla komórek satelitowych. Tylko taka obserwacja pozwala na właściwą weryfikację potencjału miogenicznego wprowadzonych komórek, a pozytywny wynik daje szansę na uzyskanie długofalowych efektów transplantacji komórek.

Oprócz zwierząt, u których regeneracja jest wywołana uszkodzeniem mięśnia, w doświadczeniach *in vivo* wykorzystuje się także zwierzęta, które stanowią zwierzęce modele chorób mięśni występujących u ludzi. Przykładem mogą być wspomniane już myszy *mdx* oraz myszy SMN (ang. *survival of motor neurons*), które stanowią zwierzęcy model choroby określanej jako rdzeniowy zanik mięśni [44]. W mięśniach szkieletowych obu rodzajów myszy obserwuje się „spontaniczną” regenerację indukowaną w odpowiedzi na rozwój choroby (ryc. 2). Regeneracja mięśni dystroficznych przebiega „standardowo” we wczesnych stadiach choroby. Jednak w wyniku kolejnych rund regeneracji i degeneracji mięśni populacja komórek satelitowych ulega wyczerpaniu. Następstwem tego są poważne zaburzenia struktury i funkcji mięśni szkieletowych, a następnie ich stopniowy zanik. Ponieważ rozwój choroby u myszy *mdx* jest dużo wolniejszy i łagodniejszy niż u ludzi, model ten nie jest doskonały. W przeciwieństwie do ludzi chorych na dystrofię Duchenne’a, mimo widocznych zmian w strukturze mięśni myszy *mdx* są zdolne do poruszania się, a długość ich życia jest tylko nieznacznie krótsza w porównaniu z myszami typu dzikiego. Różnice w przebiegu choroby u ludzi i myszy tłumaczy się większą zdolnością mięśni szkieletowych myszy do regeneracji, a także częściową kompensacją braku dystrofiny przez inne białka strukturalne, np. utrofinę [3]. Pomimo tego myszy *mdx* stanowią popularny model wykorzystywany do oceny potencjału miogenicznego komórek macierzystych. Dowodem na to, że przeszczepione komórki macierzyste biorą udział w regeneracji mięśni myszy *mdx* jest synteza dystrofiny, poprawa architektury i zwiększenie siły skurczu mięśnia.

Z kolei u myszy SMN obserwuje się postępującą degenerację mięśni szkieletowych wywołaną nieprawidłowym unerwieniem tej tkanki, co prowadzi do przedwczesnej śmierci zwierząt [37, 44]. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały jednak, że proces ten może zostać zahamowany przez wprowadzenie do mięśni myszy SMN różnych rodzajów komórek macierzystych, m.in. komórek satelitowych i komórek izolowanych ze szpiku kostnego [43, 51]. Obecność tych komórek nie tylko wpłynęła na poprawę struktury i funkcjonowania mięśni, ale także przedłużyła życie tych myszy, co stanowi kluczowy argument przemawiający za kontynuowaniem badań poświęconych poszukiwaniu najlepszego źródła komórek do terapii chorób mięśni.

Potencjał miogeniczny komórek macierzystych można badać nie tylko w regenerujących, ale także w rozwijających się mięśniach szkieletowych. Doświadczenia takie polegają na wprowadzeniu badanych komórek do zarodków myszy na stadium blastocysty, a następnie przeszczepieniu blastocysty do dróg rodnych samicy. Jeśli wprowadzone blastocysty ulegną implantacji w macicy samicy-biorczyni, można

spodziewać się, że badane komórki wezmą udział w tworzeniu tkanek rozwijającego się zarodka, w tym również mięśni szkieletowych. Udział poddawanych analizie komórek macierzystych w budowie mięśni szkieletowych można oceniać na różnych etapach rozwoju zarodka, a także po narodzinach uzyskanego w ten sposób zwierzęcia chimerowego. Stosując tę technikę Schulze i współpracownicy wykazali, że mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego mogą brać udział w tworzeniu mięśni szkieletowych [56].

4. POTENCJAŁ MIOGENICZNY KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Dotychczas przeprowadzono wiele badań weryfikujących potencjał miogeniczny komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł. Najwięcej publikacji naukowych poświęconych jest roli komórek macierzystych ze szpiku kostnego, mezenchymalnych komórek macierzystych, komórek macierzystych z naczyń krwionośnych oraz zarodkowych komórek macierzystych (tab. 1) w regeneracji mięśni szkieletowych.

a. Hematopoetyczne komórki macierzyste

Pierwszym rodzajem komórek macierzystych, które wzbudziły zainteresowanie jako potencjalne źródło komórek do wykorzystania w terapii chorób mięśni szkieletowych, były komórki izolowane ze szpiku kostnego. Obecne są w nim co najmniej dwie populacje komórek macierzystych, tj. hematopoetyczne komórki macierzyste – HSC (ang. *hematopoietic stem cells*) i mezenchymalne komórki macierzyste – MSC (ang. *mesenchymal stem cells*). HSC odpowiedzialne są za wytwarzanie wszystkich komórek krwi, zaś MSC są źródłem cytokin i czynników wzrostu oraz zapewniają odpowiednie mikrośrodowisko w szpiku kostnym. Pionierskie doświadczenia przeprowadzone przez Meyera i Yaroma w latach 80. udowodniły, że obecność komórek izolowanych ze szpiku znacząco poprawiała przebieg regeneracji mięśni szkieletowych szczurów i małp, a także zmniejszała włóknienie tkanki mięśniowej [61]. W 1988 roku Ferrari i współpracownicy wykazali, że komórki izolowane ze szpiku kostnego są zdolne do zasiedlenia uszkodzonego mięśnia szkieletowego, a w odpowiedzi na sygnały docierające ze środowiska są w stanie różnicować i brać udział w odtwarzaniu włókien mięśniowych [47]. Kolejne doniesienia sugerowały jednak, że mimo iż transplantacji komórek uzyskanych ze szpiku kostnego do mięśni myszy *mdx* towarzyszyło wznowienie syntezy dystrofiny w powstających włóknach mięśniowych, to wprowadzone komórki były włączane do zaledwie 1% regenerujących włókien [27]. W tym samym czasie LaBarge i Blau opublikowali jednak pracę, w której wykazali, że komórki macierzyste wyizolowane ze szpiku kostnego myszy transgenicznej, w której komórkach dochodzi do ekspresji GFP (ang. *green fluorescent protein*), i wprowadzone przez żyłę ogonową do krwioobiegu myszy biorczyni wzięły udział w odtworzeniu 3,5% zregenerowanych włókien. Ponadto komórki syntetyzujące białko GFP były zdolne do zasiedlenia niszy komórek

TABELA 1. Porównanie wybranych populacji komórek macierzystych pod względem potencjału miogenicznego. Wytuszczone nazwy rodzajów komórek wskazują te, które w chwili obecnej budzą największe nadzieje na zastosowanie w terapii chorób mięśni szkieletowych
 TABLE 1. Comparison of myogenic potential of selected types of stem cells. Names in bold indicate those types of cells that currently are considered to be the best source of cells in the therapy for skeletal muscle diseases

Komórki	Zalety	Wady	Literatura
Komórki satelitowe	ogromny potencjał regeneracyjny <i>in vivo</i> , zasiedlanie niszy komórek satelitowych biorecy, funkcjonalna poprawa zasiedlonych mięśni, brak konieczności wstępnego różnicowania komórek	ograniczona liczba komórek, trudności w izolacji i hodowli <i>in vitro</i> bez utraty potencjału regeneracyjnego	Collins i wsp. 2005 [16] Montarras i wsp. 2005 [42] Cerletti i wsp. 2008 [12] Sacco i wsp. 2008 [50]
HSC	rutynowo izolowane ze szpiku kostnego, wykazują potencjał miogeniczny <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	zasiedlają mięśnie szkieletowe z niską częstością, komórki obecne w niszy komórek satelitowych są niefunkcjonalne, nieznanym mechanizmem różnicowania	Camargo i wsp. 2003 [10] Corbel i wsp. 2003 [17] Sherwood i wsp. 2004 [57] Sherwood i wsp. 2004 [58] Abedi i wsp. 2007 [1]
MSC	występują w wielu niszach w organizmie, są dostępne, łatwe w izolacji i hodowli <i>in vitro</i> , wykazują potencjał miogeniczny <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> , zasiedlają mięśnie z wysoką częstością (60%), zasiedlają niszę komórek satelitowych (kilkanaście procent), syntetyzują charakterystyczne markery i biorą udział w kolejnych rundach regeneracji, tolerowane przez układ immunologiczny gospodarza	sprecyzowane wyniki na temat ich mechanizmu różnicowania (fuzja vs "autonomizacja"), zmiana wzoru ekspresji genów, brak oceny wpływu obecności komórek na siłę kurczu mięśni i funkcje motoryczne zwierzęcia (testy fizjologiczne)	Waktiani i wsp. 1995 [65] De Bari i wsp. 2003 [23] Schulze i wsp. 2005 [56] Dezawa i wsp. 2005 [25] Gang i wsp. 2008 [30]
Mezangio-blasty	zdolne do różnicowania w warunkach <i>in vitro</i> , zasiedlają niemal wszystkie mięśnie szkieletowe po wprowadzeniu do układu krążenia, wykrywane w 80% włókien mięśniowych, poprawiają funkcje motoryczne zwierzęcia	konieczność opracowania metody wydajnej izolacji komórek, wyniki muszą zostać potwierdzone przez inne grupy badawcze	De Angelis i wsp. 1999 [22] Sampaolesi i wsp. 2003 [53] Sampaolesi i wsp. 2006 [52]
Komórki AC133+	obecne w kilku niszach w organizmie, łatwe w izolacji ze względu na określony marker powierzchniowy (białko D133) zdolne do różnicowania w warunkach <i>in vitro</i> , po transplantacji tworzą hybrydowe włókna i zasiedlają niszę komórek satelitowych, ich obecność w mięśniu poprawia siłę skurczu, ogranicza rozwój fibrozy i powoduje lepsze ukrwienie	konieczność przeprowadzenia badań klinicznych	Torrente i wsp., 2004 [64] Gavina i wsp., 2006 [32] Shi i wsp., 2009 [59]
Komórki ES	zdolne do podjęcia różnicowania miogenicznego w warunkach <i>in vitro</i> , obecne w mięśniu nawet 6 miesięcy po transplantacji, wykrywane w 20% włókien mięśniowych, poprawiają funkcje motoryczne zwierząt, zasiedlają niszę komórek satelitowych z niską częstością, zdolność do nieograniczonej proliferacji i samoodnawiania, uzyskanie indukowanych komórek pluripotentnych ze źródła niebudzącego kontrowersji etycznych	samoistne różnicowanie komórek ES w kulach zarodkowych zachodzi z niską częstością, nieznanym mechanizmem różnicowania, syntetyzują tylko niektórych markerów miogenicznych, możliwość tworzenia guzów nowotworowych po transplantacji, sprecyzowane wyniki na temat immunogenności komórek ES, kontrowersje etyczne dotyczące uzyskiwania komórek ES z zarodków	Rohwedel i wsp., 1994 [49] Barberi i wsp., 2005 [5] Kamochi i wsp., 2006 [36] Zheng i wsp., 2006 [70] Barberi i wsp., 2007 [4] Darabi i wsp., 2008 [19] Chang i wsp., 2009 [14]

satelitowych i ekspresji markerów miogenicznych, takich jak: Myf-5, integryna $\alpha 7$ i c-Met [47]. Komórki syntetyzujące GFP (komórki dawcy), które wyizolowano z mięśni myszy biorczyń, były zdolne do podjęcia różnicowania *in vitro* i utworzenia wielojądrowych miotub.

W 2003 roku opublikowano wyniki doświadczeń, w których do uszkodzonych mięśni szkieletowych wprowadzono wyłącznie wyselekcjonowane, hematopoetyczne komórki macierzyste, a nie mieszaninę wszystkich komórek izolowanych ze szpiku kostnego, jak poprzednio. Camargo i współpracownicy oraz Corbel i współpracownicy niezależnie wykazali, że pojedyncza komórka HSC wprowadzona do organizmu biorcy wykazuje nie tylko potencjał hematopoetyczny, ale także miogeniczny. Wywodzące się z niej komórki potomne zasiedlały uszkodzony mięsień szkieletowy i brały udział w tworzeniu hybrydowych włókien, jednak nie były zdolne ani do zasiedlenia niszy komórek satelitowych, ani do przekształcenia w funkcjonalne mioblasty. Zdaniem Camargo i współpracowników komórki te brały udział w regeneracji wyłącznie dzięki fuzji z komórkami biorcy podczas tworzenia nowych włókien mięśniowych [47]. Obserwacje te zostały rozszerzone o wyniki innych badań, które dowiodły, że mimo iż HSC są zdolne do zasiedlania uszkodzonego mięśnia, to jednak proces ten zachodzi z niską częstością. HSC wykryte w niszy komórek satelitowych były, w przeciwieństwie do uprzednio opisanych badań, niefunkcjonalne [57, 58]. Wyniki te zakwestionowały sens prowadzenia terapii z wykorzystaniem hematopoetycznych komórek macierzystych. Pomimo to ciągle prowadzone są badania poświęcone ustaleniu optymalnych warunków transplantacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego do mięśni szkieletowych, choć uzyskiwane wyniki są nadal niesatysfakcjonujące [1, 2, 38, 40]. Może warto więc pamiętać o hipotezie Sherwooda i współpracowników mówiącej o tym, że jeśli jakieś komórki obecne w szpiku kostnym mają potencjał miogeniczny, to nie są to z pewnością HSC, a z dużym prawdopodobieństwem mezenchymalne komórki macierzyste [58].

b. Mezenchymalne komórki macierzyste

Mezenchymalne komórki macierzyste po raz pierwszy zidentyfikowano w szpiku kostnym. Obecne są one w wielu tkankach zarówno zarodkowych, jak i dorosłych organizmów, a także we krwi pępowinowej i płynie owodniowym [11, 39]. Komórki te są więc łatwiej dostępne niż np. komórki macierzyste szpiku kostnego. Wiadomo również, że MSC mogą różnicować w wiele tkanek pochodzenia mezodermalnego, w tym np. tkankę tłuszczową, chrząstkę czy kość. W 1995 roku po raz pierwszy stwierdzono, że wykazują one także potencjał miogeniczny. Badania przeprowadzone przez grupę pod kierownictwem Caplana wykazały, że MSC wyizolowane ze szpiku kostnego szczura i hodowane w obecności 5-AzaC różnicują w mioblasty, syntetyzują specyficzne mięśniowo czynniki, takie jak np. miozyna, oraz tworzą wielojądrowe, spontanicznie kurczące się miotuby [11]. Ci sami naukowcy wykazali też, że komórki te hodowane z mioblastami tworzą hybrydowe miotuby, a po wprowadzeniu MSC do mięśni myszy *mdx* zaobserwowano nie tylko wzrost masy mięśni, ale także ekspresję dystrofiny w nowopowstających włóknach. Zdaniem autorów świadczyło

to o tym, że w populacji MSC znajdują się komórki zdolne do różnicowania w mioblasty [11]. W roku 2002 i 2003 de Bari i współpracownicy stwierdzili, że ludzkie MSC wyizolowane z błony maziowej i wprowadzone do mięśni myszy SCID-*mdx* są zdolne do ekspresji jedynie jednego markera miogenicznego – Myf-5. Pomimo to komórki te uczestniczyły w tworzeniu 60% nowopowstałych włókien, a także zasiedliły niszę charakterystyczną dla komórek satelitowych. Także MSC izolowane z krwi pępowinowej, płynu owodniowego oraz krwi płodowej różnicują i tworzą włókna mięśniowe w odpowiedzi na czynniki, takie jak: 5-azaC, sterydy, surowica końska czy wydzielana przez różnicujące mioblasty galektyna [13, 24, 31]. We wszystkich przypadkach hodowane komórki syntetyzowały charakterystyczne dla mięśni szkieletowych białka.

Dla zrozumienia mechanizmu udziału MSC w regeneracji mięśni istotne było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy ich różnicowanie jest wynikiem „autonomicznej” reakcji na stosowane bodźce, czy też wiąże się z fuzją tych komórek z mioblastami i ich włączaniem do tworzących się miotub i włókien mięśniowych. Wyniki uzyskane przez grupę kierowaną przez Brauna świadczyły o tym, że MSC hodowane w obecności komórek wydzielających czynniki istotne dla różnicowania komórek mięśniowych, takie jak Wnt7a czy Wnt11 są zdolne do podjęcia różnicowania, ale samodzielnie nie są w stanie utworzyć funkcjonalnych komórek mięśniowych, a ich pełne różnicowanie wymaga kontaktu i fuzji z mioblastami [6, 56]. Hipoteza Brauna i współpracowników mówiąca o niemożności pełnego i niezależnego od fuzji z mioblastami różnicowania macierzystych komórek mezenchymalnych wydaje się być jednak sprzeczna z obserwacjami innych grup badawczych, m.in. Dezawy i współpracowników oraz Ganga i współpracowników. Wykazali oni, że w hodowanych *in vitro* MSC, w których doprowadzono do nadekspresji czynników regulujących miogenezę, takich jak Notch1 i Pax3, dochodzi do ekspresji zarówno markerów charakterystycznych dla „wczesnych” (MyoD, Myf-5), jak i „późnych” stadiów różnicowania mioblastów (miogenina, ciężkie łańcuchy miozyny [25, 30]). Komórki te tworzyły także zdolne do spontanicznych skurczów wielojądrowe miotuby. Warto zaznaczyć, że w populacji różnicujących MSC obecne były także takie, które syntetyzowały markery komórek satelitowych – Pax7, Myf-5 i c-Met, co jest niezwykle istotnym „parametrem” świadczącym o potencjale miogenicznym badanych komórek [25, 30].

Oprócz wyników doświadczeń przeprowadzonych *in vitro*, niezwykle obiecujące dla opracowania metod potencjalnej terapii są również rezultaty badań prowadzonych w warunkach *in vivo*. Dezawa i współpracownicy wykazali, że MSC zaindukowane do różnicowania w komórki mięśniowe przez nadekspresję białka Notch-1, a następnie wprowadzone do regenerujących mięśni, były wykrywane w 30–40% zregenerowanych włókien [25]. Komórki te zasiedlały także niszę komórek satelitowych i co istotne brały udział w kolejnych rundach regeneracji. W regeneracji mięśni szkieletowych myszy SCID mogą uczestniczyć również ludzkie komórki krwi pępowinowej, które po wstrzyknięciu do uszkodzonych mechanicznie mięśni szkieletowych biorą udział w budowie około 10% nowych włókien mięśniowych i zasiedlają

nisze charakterystyczne dla komórek satelitowych [9]. Udowodniony potencjał miogeniczny oraz możliwość pozyskania mezenchymalnych komórek macierzystych z różnych źródeł czyni z nich potencjalne źródło materiału do przeszczepów.

c. Komórki macierzyste pochodzące z naczyń krwionośnych

Oprócz MSC, duże nadzieje na wykorzystanie w leczeniu dystrofii i poprawie regeneracji mięśni szkieletowych budzą komórki macierzyste pochodzące z naczyń krwionośnych, tj. mezangioblasty oraz komórki syntetyzujące CD133 i określane jako AC133+. Pierwsze z nich, mezangioblasty, opisano po raz pierwszy w 1999 roku jako syntetyzujące markery endotelialne i miogeniczne komórki obecne w ścianie aorty grzbietowej rozwijającego się zarodka myszy [18]. Hodowane *in vitro* mezangioblasty nie różnią się morfologią od mioblastów, poza tym syntetyzują one m.in. MyoD, Myf-5 oraz M-kadherynę i są zdolne do fuzji z mioblastami. Najistotniejsze jest jednak to, że wprowadzenie mezangioblastów do krwioobiegu myszy lub psów cierpiących na dystrofię prowadzi do ich rozległej migracji w mięśniach poprzez system kapilar, dzięki czemu są one wykrywane nawet w 70% włókien [52]. Obecność mezangioblastów w dystroficznych mięśniach doprowadziła do poprawy funkcji zasiedlonej tkanki, co stwierdzono między innymi na podstawie analizy siły skurczów mięśni [18]. Poprzedzająca przeszczep ekspozycja mezangioblastów na stromalny czynnik wzrostu (SDF-1), przy równoczesnej nadekspresji L-selektyny w tych komórkach, zwiększyła ich zdolność do migracji i adhezji. W konsekwencji po wprowadzeniu do organizmu komórki te brały udział w budowie ponad 80% włókien mięśniowych [29]. Przytoczone wyniki badań czynią z mezangioblastów jeden z najbardziej obiecujących rodzajów komórek możliwych do wykorzystania w terapii dysfunkcyjnych mięśni szkieletowych. Ciągłe jednak istnieje potrzeba opracowania wydajnej i wysoce selektywnej metody izolacji tych komórek. Pozwoliłoby to na odrzucenie zarzutów o możliwej kontaminacji populacji mezangioblastów przez inne komórki, a także o wpływie stosowanych przez autorów leków immunosupresyjnych na poprawę funkcjonowania mięśni dystroficznych [8, 21, 48].

Inną grupą komórek związaną z naczyniami krwionośnymi są komórki syntetyzujące białko powierzchniowe CD133 i określane jako komórki AC133+. Komórki te obecne są m.in. w krwi obwodowej, szpiku kostnym, nerkach, trzustce, krwi pępowinowej oraz płodowej wątrobie. Wykazują one zdolność do wielokierunkowego różnicowania, m.in. w komórki linii hematopoetycznej, śródbłonkowej i neuronalnej [41]. Komórki AC133+ hodowane z mioblastami są także zdolne do rozpoczęcia różnicowania miogenicznego wyrażanego ekspresją takich czynników, jak: Pax7, Myf5, M-kadheryna i CD34 [64]. Wprowadzenie ich do krwioobiegu myszy *mdx* doprowadziło do znaczącej poprawy regeneracji dystroficznych mięśni, utworzenia przez komórki AC133 włókien syntetyzujących dystrofinę oraz zasiedlenia przez nie niszy komórek satelitowych. Ich obecność w mięśniach wpłynęła także na wzrost siły skurczu mięśni [64]. Potencjał miogeniczny komórek AC133+ został potwierdzony w kolejnych badaniach, które wykazały między innymi, że wzrost ekspresji odpowiedzialnego za adhezję białka VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion*

molecule-1) w mięśniach szkieletowych, wywołany wysiłkiem fizycznym, czterokrotnie zwiększył liczbę włókien mięśniowych powstałych przy udziale komórek AC133+ [32]. Obecność komórek AC133+ w regenerujących mięśniach wpłynęła na przyspieszenie procesu rekonstrukcji mięśni przez ograniczenie rozwoju fibrozy oraz lepsze ukrwienie regenerującego mięśnia [59].

Zdolność komórek AC133+ oraz mezangioblastów do migracji w naczyniach krwionośnych umożliwiającą im zasiedlenie niemal wszystkich mięśni szkieletowych, a także wpływ tych komórek na poprawę struktury i fizjologii mięśni szkieletowych sprawiają, że są one uważane za „najpoważniejszych” kandydatów do wykorzystania w terapii komórkowej dystrofii mięśniowych.

d. Zarodkowe komórki macierzyste

Zarodkowe komórki macierzyste – komórki ES (ang. *embryonic stem cells*) są komórkami pluripotencjalnymi, zdolnymi do różnicowania we wszystkie linie komórek i tkanek budujących organizm. Stosując odpowiednie warunki hodowli *in vitro* można sprawić, że będą one tworzyły trójwymiarowe agregaty określane jako kule zarodkowe, zbudowane z ekto-, endo- i mezodermy. *In vivo*, po wprowadzeniu komórek ES np. pod skórę myszy SCID, przejawem ich pluripotencji jest tworzenie teratom, czyli łagodnych guzów nowotworowych zawierających różne rodzaje tkanek. W teratomach znajdowane są również komórki wykazujące ekspresję genów charakterystycznych dla tkanki mięśniowej szkieletowej [66]. Sugeruje to, że komórki ES mają potencjał miogeniczny, pomimo że utrzymywane w stanie nie zróżnicowanym nie syntetyzują czynników mięśniowych [4, 5, 14, 20, 36, 63, 70]. Po raz pierwszy obecność komórek ekspresujących czynniki MRF została stwierdzona w kulach zarodkowych w 1994 roku przez Rohwedela i współpracowników. Analiza ta była oparta jedynie na obserwacji zmian morfologii komórek oraz wykrywaniu transkryptów MRF metodą RT-PCR, co stało się podstawą wątpliwości podnoszonych przez inne grupy badawcze. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały bowiem, że komórki budujące kule zarodkowe nie są zdolne do „samodzielnego” rozpoczęcia różnicowania w mioblasty [19, 54] lub też różnicowanie takie zachodzi bardzo sporadycznie [63, 70]. Indukcja różnicowania w mioblasty była możliwa dopiero po zastosowaniu dodatkowego czynnika (np. sperminy lub 5-AzaC) [54, 70]. Jednak uzyskane w ten sposób komórki syntetyzują tylko niektóre markery miogeniczne i fuzują z niską częstością, co stawia pod znakiem zapytania ich funkcjonalność.

Inna strategia indukcji różnicowania miogenicznego komórek ES została wykorzystana przez Barberi'ego i współpracowników. Hodowali oni ludzkie komórki ES w kokulturze z komórkami zrębu szpiku, które wydzielają czynniki promujące różnicowanie w mezodermę. Po 6 tygodniach spośród hodowanych komórek wyselekcjonowano te, które syntetyzowały charakterystyczne dla komórek mezodermalnych białko CD73, a następnie hodowano je w warunkach umożliwiających ich różnicowanie w mioblasty. Uzyskane komórki nie były jednak zdolne do podjęcia takiego różnicowania – nie wykryto w nich obecności żadnych markerów miogenicznych, ani nie zaobserwowano zmian morfologii. Dopiero hodowla komórek CD73+

w obecności mioblastów linii komórkowej C2C12 lub inkubacja z 5-AzaC zaindukowały ekspresję *myoD* i *miogeniny* [5]. Modyfikacja procedury doświadczenia o dodatkową selekcję komórek, które syntetyzowały charakterystyczne m.in. dla komórek satelitowych i różnicujących mioblastów białko N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*), przyniosła lepsze wyniki. Po 6 tygodniach hodowli od 2 do 10% komórek komórek CD73+ i N-CAM+ syntetyzowało markery miogeniczne [4]. Wyselekcjonowane w ten sposób komórki wykrywano jeszcze po 6 miesiącach od ich wprowadzenia do uszkodzonych mięśni szkieletowych myszy SCID [4].

Najlepsze rezultaty w uzyskiwaniu komórek mięśniowych z komórek ES otrzymano w wyniku nadekspresji określonych czynników w komórkach ES. Nadekspresja insulinopodobnego czynnika wzrostu II – IGFII (ang. *insulin-like growth factor-II*), wydzielanego przez różnicujące mioblasty zarówno w hodowli *in vitro*, jak i w regenerującym mięśniu szkieletowym, doprowadziła do rozpoczęcia syntezy MyoD, Myf5, miogeniny i M-kadheryny. Komórki, w których zaindukowano zwiększoną ekspresję *igfII*, były zdolne do fuzji i utworzenia wielojądrowych, kurczących się miotub [36, 66]. Natomiast nadekspresja genu *pax3* doprowadziła do zmiany morfologii zarodkowych komórek macierzystych oraz do ekspresji czynników miogenicznych [19].

Potencjał miogeniczny komórek ES został także poddany ocenie w warunkach *in vivo*. Bhagavati i Xu przeprowadzili doświadczenia, w których wykorzystano komórki ES hodowane uprzednio przez kilka dni z mioblastami. Procedura ta miała zaindukować różnicowanie komórek ES w mioblasty. Dowodem na potencjał miogeniczny tych komórek miał być ich udział w regeneracji mięśni myszy *mdx* i obecność włókien, w których stwierdzono syntezę dystrofiny [7]. Jednak liczba włókien zawierających dystrofinę była bardzo mała i mogła być wynikiem tzw. „spontanicznego odwrócenia mutacji”. Zjawisko to obserwowane jest u myszy *mdx*, u których pomimo mutacji w genie kodującym dystrofinę sporadycznie wykrywa się obecność tego białka w mięśniach [67]. Transplantacja wstępnie zróżnicowanych komórek ES do mięśni szkieletowych, a następnie ocena skutków takiego zabiegu została przeprowadzona także przez kilka innych grup badawczych. Wprowadzenie komórek ES, w których najpierw zaindukowano ekspresję *igfII*, wpłynęło na poprawę funkcji motorycznych regenerujących mięśni już po 14 dniach od zabiegu [36]. Transplantowane komórki syntetyzowały specyficzne mięśniowo czynniki oraz receptory acetylocholino, co świadczyło o dojrzewaniu utworzonych włókien mięśniowych oraz tworzeniu funkcjonalnych płytek motorycznych. W mięśniach, do których wprowadzono komórki ES zaindukowane do różnicowania przez nadekspresję genu *pax3*, częstość występowania włókien zasiedlonych przez te komórki wyniosła 10–20% [19]. Mimo że wprowadzone do mięśnia komórki syntetyzowały M-kadherynę, syndekan-4 i CD34, markery komórek satelitowych, to transplantowanych komórek nie wykryto w niszy komórek satelitowych. Zasiedlenie niszy komórek satelitowych stwierdzono w innych doświadczeniach, w których wykorzystano komórki ES uprzednio zaindukowane do różnicowania przez hodowlę w obecności epidermalnego czynnika wzrostu, 5-azaC lub surowicy końskiej [14, 70]. Komórki

takie były zdolne do syntezy markerów komórek satelitowych, takich jak: Pax7, Myf-5, c-Met, M-kadheryna, i brały udział w kolejnych rundach regeneracji, mimo iż zasiedlały niszę komórek satelitowych z niską częstością. Przeszczepianie do mięśni wstępnie zróżnicowanych komórek znacząco zwiększa możliwość wykorzystania komórek ES w terapii chorób mięśni.

Do najważniejszych problemów stojących przed badaczami oceniającymi szanse na wykorzystanie komórek ES w medycynie regeneracyjnej jest zagrożenie związane z powstawaniem w organizmie biorcy teratom, problemy związane z usuwaniem przeszczepionych komórek w wyniku reakcji immunologicznej oraz budzące zastrzeżenia natury etycznej „zarodkowe pochodzenie” komórek ES. Tworzenie teratom u myszy, którym wszczepiono komórki ES, stwierdzono tylko w nielicznych przypadkach, gdy niezróżnicowane komórki były przeszczepiane do tkanek myszy z upośledzonym układem odporności [19, 63]. Jednak w większości opisanych badań, w których wykorzystywano wstępnie zróżnicowane komórki ES, nie zaobserwowano rozwoju guzów [4, 14, 70]. Według Tiana i współpracowników brak teratom w organizmie niepoddawanego immunosupresji, „allogenicznego” biorcy świadczy o usunięciu tych komórek z zasiedlonego mięśnia w wyniku odpowiedzi immunologicznej [63]. Jednak w dwóch niezależnych badaniach potwierdzono obecność komórek ES w mięśniach biorcy pomimo wykorzystania w doświadczeniu „układu allogenicznego” [14, 36]. Trzeba jednak wspomnieć, że Autorzy pierwszej pracy nie podali częstości występowania tych komórek, w drugiej pracy opisano, że były one obecne jedynie w 1% wszystkich włókien.

Zatem mimo obiecujących wyników przeprowadzonych do tej pory badań, ciągle istnieje wiele niewiadomych dotyczących możliwości różnicowania komórek ES w warunkach *in vitro* i *in vivo*, a także oceny skutków transplantacji tych komórek do organizmu biorcy.

W 2006 roku z fibroblastów uzyskano indukowane komórki pluripotencjalne – iPS (ang. *induced pluripotent stem* [62]). W kolejnych latach komórki takie otrzymano także z innych rodzajów komórek [55]. Ponieważ pochodzenie komórek iPS jak dotychczas nie budzi wątpliwości natury etycznej, należy rozważać je jako nowe źródło komórek, które mogłyby w przyszłości wspomagać regenerację mięśni szkieletowych. Ze względu na wiele cech wspólnych w badaniach komórek iPS wykorzystywana jest wiedza uzyskana z badań nad komórkami ES. Stwarza to nadzieję na szybki postęp badań, a co za tym idzie identyfikację czynników, które pozwoliłyby nie tylko wydajnie uzyskiwać z komórek pluripotencjalnych komórki mięśniowe, ale także dokładnie przeanalizować mechanizmy ich różnicowania.

5. PODSUMOWANIE

Jednym z najbardziej fascynujących aspektów badań nad biologią komórek macierzystych jest szansa na opracowanie nowych terapii chorób, których do tej pory nie można było skutecznie leczyć. Prace badawcze nad zastosowaniem komórek

macierzystych jako potencjalnego źródła komórek do wspomagania regeneracji mięśni szkieletowych są prowadzone od wielu lat i w wielu laboratoriach. Przytoczone powyżej wyniki badań przyczyniły się do lepszego poznania różnych populacji komórek, dzięki czemu być może niektóre z nich (np. mezenchymalne komórki macierzyste) znajdą w przyszłości zastosowanie w leczeniu chorób mięśni. Jednakże pomimo prowadzenia intensywnych analiz wiele pytań dotyczących udziału niemięśniowych komórek macierzystych w regeneracji mięśni szkieletowych pozostaje bez odpowiedzi.

6. LITERATURA

- [1] ABEDI M, FOSTER BM, WOOD KD, COLVIN GA, MCLEAN SD, JOHNSON KW, GREER DA. Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *Br J Haematol* 2007; **138**: 792–801.
- [2] ABEDI M, GREER DA, FOSTER BM, COLVIN GA, HARPEL JA, DEMERS DA, PIMENTEL J, DONER MS, QUESENBERRY PJ. Critical variables in the conversion of marrow cells to skeletal muscle. *Blood* 2005; **106**: 1488–1494.
- [3] BANKS GB, CHAMBERLAIN JS. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr Top Dev Biol* 2008; **84**: 431–453.
- [4] BARBERI T, BRADBURY M, DINCER Z, PANAGIOTAKOS G, SOCCI ND, STUDER L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 2007; **13**: 642–648.
- [5] BARBERI T, WILLIS LM, SOCCI ND, STUDER L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2005; **2**: e161.
- [6] BEDADA FB, BRAUN T. Partial induction of the myogenic program in noncommitted adult stem cells. *Cells Tissues Organs* 2008; **188**: 189–201.
- [7] BHAGAVATI S, XU W. Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 644–649.
- [8] BRUNELLI S, SCIORATI C, D'ANTONA G, INNOCENZIA, COVARELLO D, GALVEZ BG, PERROTTA C, MONOPOLI A, SANVITO F, BOTTINELLI R, ONGINIE, COSSU G, CLEMENTIE. Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 264–269.
- [9] BRZOSKA E, GRABOWSKA I, HOSER G, STREMIŃSKA W, WASILEWSKA D, MACHAJ EK, POJDA Z, MORACZEWSKI J, KAWIAK J. Participation of stem cells from human cord blood in skeletal muscle regeneration of SCID mice. *Exp Hematol* 2006; **34**: 1262–1270.
- [10] CAMARGO FD, GREEN R, CAPETANAKI Y, JACKSON KA, GOODELL MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 2003; **9**: 1520–1527.
- [11] CAPLAN AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; **217**: 318–324.
- [12] CERLETTI M, JURGA S, WITCZAK CA, HIRSHMAN MF, SHADRACH JL, GOODYEAR LJ, WAGERS AJ. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell* 2008; **134**: 37–47.
- [13] CHAN J, O'DONOGHUE K, GAVINA M, TORRENTE Y, KENNEA N, MEHMET H, STEWART H, WATT DJ, MORGAN JE, FISK NM. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells* 2006; **24**: 1879–1891.
- [14] CHANG H, YOSHIMOTO M, UMEDA K, IWASA T, MIZUNO Y, FUKADA S, YAMAMOTO H, MOTOHASHI N, MIYAGOE-SUZUKI Y, TAKEDA S, HEIKE T, NAKAHATA T. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *Faseb J* 2009; **23**: 1907–1919.
- [15] CHARGE SB, RUDNICKI MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; **84**: 209–238.
- [16] 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.

- [17] CORBEL SY, LEE A, YI L, DUENAS J, BRAZELTON TR, BLAU HM, ROSSI FM. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* 2003; **9**: 1528–1532.
- [18] COSSU G, SAMPAOLESI M. New therapies for muscular dystrophy: cautious optimism. *Trends Mol Med* 2004; **10**: 516–520.
- [19] DARABI R, GEHLBACH K, BACHOO RM, KAMATH S, OSAWA M, KAMM KE, KYBA M, PERLINGEIRO RC. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008; **14**: 134–143.
- [20] DARABI R, SANTOS FN, PERLINGEIRO RC. The therapeutic potential of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; **4**: 217–225.
- [21] DAVIES KE, GROUNDS MD. Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell* 2006; **127**: 1304–1306.
- [22] DE ANGELIS L, BERGHELLA L, COLETTA M, LATTANZI L, ZANCHI M, CUSELLA-DE ANGELIS MG, PONZETTO C, COSSU G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999; **147**: 869–878.
- [23] DE BARI C, DELL'ACCIO F, VANDENABEELE F, VERMEESCH JR, RAYMACKERS JM, LUYTEN FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; **160**: 909–918.
- [24] DE COPPI P, BARTSCH G, JR., SIDDIQUI MM, XU T, SANTOS CC, PERIN L, MOSTOSLAVSKY G, SERRE AC, SNYDER EY, YOO JJ, FURTH ME, SOKER S, ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 100–106.
- [25] DEZAWA M, ISHIKAWA H, ITOKAZU Y, YOSHIHARA T, HOSHINO M, TAKEDA S, IDE C, NABESHIMA Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 2005; **309**: 314–317.
- [26] EMERY AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; **359**: 687–695.
- [27] FERRARI G, MAVILIO F. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 2002; **12** Suppl 1: S7–10.
- [28] FLETCHER JE, HUBERT M, WIELAND SJ, GONG QH, JIANG MS. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon* 1996; **34**: 1301–1311.
- [29] GALVEZ BG, SAMPAOLESI M, BRUNELLI S, COVARELLO D, GAVINA M, ROSSI B, CONSTANTIN G, TORRENTE Y, COSSU G. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol* 2006; **174**: 231–243.
- [30] GANG EJ, BOSNAKOVSKI D, SIMSEK T, TO K, PERLINGEIRO RC. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 1721–1733.
- [31] GANG EJ, JEONG JA, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; **22**: 617–624.
- [32] GAVINA M, BELICCHI M, ROSSI B, OTTOBONI L, COLOMBO F, MEREGALLI M, BATTISTELLI M, FORZENIGO L, BIONDETTI P, PISATI F, PAROLINI D, FARINIA, ISSEKUTZ AC, BRESOLIN N, RUSTICHELLI F, CONSTANTIN G, TORRENTE Y. VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood* 2006; **108**: 2857–2866.
- [33] HAWLEY RG, SOBIESKI DA. Of mice and men: the tale of two therapies. *Stem Cells* 2002; **20**: 275–278.
- [34] HIPPI J, ATALA A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2008; **4**: 3–11.
- [35] ITO M, KOBAYASHI K, NAKAHATA T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; **324**: 53–76.
- [36] KAMOCHI H, KUROKAWA MS, YOSHIKAWA H, UEDA Y, MASUDA C, TAKADA E, WATANABE K, SAKAKIBARA M, NATUKI Y, KIMURA K, BEPPU M, AOKI H, SUZUKI N. Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation* 2006; **82**: 516–526.
- [37] LUNN MR, WANG CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet* 2008; **371**: 2120–2133.
- [38] LUTHES, JUN SJ, WESSEN MK, LIADAKI K, GUSSONI E, KUNKEL LM. Bone marrow side population cells are enriched for progenitors capable of myogenic differentiation. *J Cell Sci* 2008; **121**: 1426–1434.
- [39] MARKERT CD, ATALAA, CANN JK, CHRIST G, FURTH M, AMBROSIO F, CHILDERS MK. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Pm R* 2009; **1**: 547–559.

- [40] MATZIOLIS G, WINKLER T, SCHASER K, WIEMANN M, KROCKER D, TUISCHER J, PERKA C, DUDA GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng* 2006; **12**: 361–367.
- [41] MIZRAK D, BRITTAN M, ALISON MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008; **214**: 3–9.
- [42] MONTARRAS D, MORGAN J, COLLINS C, RELAX F, ZAFFRAN S, CUMANO A, PARTRIDGE T, BUCKINGHAM M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005; **309**: 2064–2067.
- [43] NICOLE S, DESFORGES B, MILLET G, LESBORDES J, CIFUENTES-DIAZ C, VERTES D, CAO ML, DE BACKER F, LANGUILLE L, ROBLOT N, JOSHI V, GILLIS JM, MELKI J. Intact satellite cells lead to remarkable protection against *Smn* gene defect in differentiated skeletal muscle. *J Cell Biol* 2003; **161**: 571–582.
- [44] NICOLE S, DIAZ CC, FRUGIER T, MELKI J. Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* 2002; **26**: 4–13.
- [45] OUSTANINA S, HAUSE G, BRAUN T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *Embo J* 2004; **23**: 3430–3439.
- [46] PEAULT B, RUDNICKI M, TORRENTE Y, COSSU G, TREMBLAY JP, PARTRIDGE T, GUSSONI E, KUNKEL LM, HUARD J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 2007; **15**: 867–877.
- [47] PRICE FD, KURODA K, RUDNICKI MA. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772**: 272–283.
- [48] RADLEY HG, DE LUCA A, LYNCH GS, GROUNDS MD. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 469–477.
- [49] ROHWEDER J, MALTSEV V, BOBER E, ARNOLD HH, HESCHELER J, WOBUS AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis *in vivo*: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 1994; **164**: 87–101.
- [50] SACCO A, DOYONNAS R, KRAFT P, VITOROVIC S, BLAU HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 2008; **456**: 502–506.
- [51] SALAH-MOHELLIBIN, MILLET G, ANDRE-SCHMUTZ I, DESFORGES B, OLASO R, ROBLOT N, COURAGEOT S, BENSIMON G, CAVAZZANA-CALVO M, MELKI J. Bone marrow transplantation attenuates the myopathic phenotype of a muscular mouse model of spinal muscular atrophy. *Stem Cells* 2006; **24**: 2723–2732.
- [52] SAMPAOLESI M, BLOT S, D'ANTONA G, GRANGER N, TONLORENZI R, INNOCENZIA, MOGNOL P, THIBAUD JL, GALVEZ BG, BARTHELEMY I, PERANI L, MANTERO S, GUTTINGER M, PANSARASA O, RINALDI C, CUSELLA DE ANGELIS MG, TORRENTE Y, BORDIGNON C, BOTTINELLI R, COSSU G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006; **444**: 574–579.
- [53] SAMPAOLESI M, TORRENTE Y, INNOCENZI A, TONLORENZI R, D'ANTONA G, PELLEGRINO MA, BARRESI R, BRESOLIN N, DE ANGELIS MG, CAMPBELL KP, BOTTINELLI R, COSSU G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003; **301**: 487–492.
- [54] SASAKI T, MATSUOKA H, SAITO M. Generation of a multi-layer muscle fiber sheet from mouse ES cells by the spermine action at specific timing and concentration. *Differentiation* 2008; **76**: 1023–1030.
- [55] SCHEPER W, COPRAY S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev Rep* 2009; **5**: 204–223.
- [56] SCHULZE M, BELEMA-BEDADA F, TECHNAU A, BRAUN T. Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes Dev* 2005; **19**: 1787–1798.
- [57] SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, CONBOY IM, CONBOY MJ, RANDO TA, WEISSMAN IL, WAGERS AJ. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 2004; **119**: 543–554.
- [58] SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL, WAGERS AJ. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2004; **22**: 1292–1304.
- [59] SHI M, ISHIKAWA M, KAMEIN, NAKASA T, ADACHI N, DEIE M, ASAHARA T, OCHI M. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells* 2009; **27**: 949–960.

- [60] SKUK D, GOULET M, ROY B, PIETTE V, COTE CH, CHAPDELAINE P, HOGREL JY, PARADIS M, BOUCHARD JP, SYLVAIN M, LACHANCE JG, TREMBLAY JP. First test of a „high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul Disord* 2007; **17**: 38–46.
- [61] SKUK D, TREMBLAY JP. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; **24**: 285–300.
- [62] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676.
- [63] TIAN C, LU Y, GILBERT R, KARPATI G. Differentiation of murine embryonic stem cells in skeletal muscles of mice. *Cell Transplant* 2008; **17**: 325–335.
- [64] TORRENTE Y, BELICCHI M, SAMPAOLESI M, PISATI F, MEREGALLI M, D'ANTONA G, TONLORENZI R, PORRETTI L, GAVINA M, MAMCHAOU K, PELLEGRINO MA, FURLING D, MOULY V, BUTLER-BROWNE GS, BOTTINELLI R, COSSU G, BRESOLIN N. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004; **114**: 182–195.
- [65] WAKITANI S, SAITO T, CAPLAN AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; **18**: 1417–1426.
- [66] WOBUS AM, BOHELER KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; **85**: 635–678.
- [67] YOKOTA T, LU QL, MORGAN JE, DAVIES KE, FISHER R, TAKEDA S, PARTRIDGE TA. Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. *J Cell Sci* 2006; **119**: 2679–2687.
- [68] ZAMMIT PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci* 2008; **121**: 2975–2982.
- [69] ZAMMIT PS, PARTRIDGE TA, YABLONKA-REUVENI Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 2006; **54**: 1177–1191.
- [70] ZHENG JK, WANG Y, KARANDIKAR A, WANG Q, GAI H, LIU AL, PENG C, SHENG HZ. Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. *Cell Res* 2006; **16**: 713–722.

Karolina Archacka

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: kczaja@biol.uw.edu.pl