ZMIANY PROFILU SEKRECYJNEGO KOMÓREK MIOGENNYCH W CZASIE RÓŻNICOWANIA

CHANGES OF MYOGENIC CELLS SECRETION PROFILE DURING DIFFERENTIATION

Marta MILEWSKA, Maciej BŁASZCZYK,
Katarzyna GRZELKOWSKA-KOWALCZYK

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Mięśnie szkieletowe są źródłem białek sekrecyjnych, miokin, regulujących procesy biologiczne na drodze auto-, para- i endokrynnej. Różnicowaniu się komórek miogennych towarzyszy ogólna zwiększona aktywność wydzielnicza. Niektóre czynniki np. folistatyno-podobne białko-1, osteoglicyna, peroksyredoksyna-1, są istotne w zatrzymaniu cyklu komórkowego mioblastów. Ekspresja chemokin z podrodzin CC i CXC, czynników TGFβ, IGF-1 i -2, semaforyn, angiopoetyny-1 i -2, G-CSF, IL-4 i IL-7 jest zbieżna z etapem fuzji różnicujących się mioblastów. Synteza fibuliny-2, tkankowego inhibitora metaloproteaz TIMP-2 i białka SPARC nie zmienia się znacząco w czasie miogenezy. Różnicujące się komórki mięśniowe wydzielają wiele cytokin hamujących miogenezę. Wiedza o czynnikach pochodzenia mięśniowego działających miejscowo i ogólnoustrojowo może być wykorzystana w terapii chorób mięśni oraz zaburzeń metabolicznych.

Słowa kluczowe: Chemokiny, czynniki wzrostu, fuzja, miogeneza, miokiny, proteomika

Summary: Skeletal muscle tissue is a source of secreted factors, myokines, regulating numerous biological processes in auto-, para- and endocrine manner. Myogenesis is accompanied by an increase in total secretory activity of myoblasts. Some muscle cell-derived factors, i.e. follistatin-like protein-1, osteoglycin, peroxyredoxin-1, are important in myoblasts' cell cycle arrest. Myocyte fusion is associated with enhanced expression of CC and CXC chemokines, TGF-β family proteins, IGF-1 and -2, semaphorins, angiopoetin-1 and -2, G-CSF, IL-4 and IL-7. Synthesis of fibulin-2, tissue inhibitor of metalloprotease TIMP-2 and SPARC protein is not markedly altered during myogenesis. Differentiating myoblasts secrete numerous cytokines, that negatively regulate myogenesis. Knowledge of skeletal muscle-derived factors acting locally or systemically contributes to development of therapies of impaired regeneration and muscle diseases as well as treatments of metabolic disturbances.

Key words: Chemokines, fusion, growth factors, myogenesis, myokines, proteomics

Wykaz stosowanych skrótów: ANGPT – angiopoetyna (ang. *Angiopoietin*), Ccl – chemokina z podrodziny CC (ang. *CC chemokine*), Cxcl – chemokina z podrodziny CXC (ang. *CXC chemokine*), Fstl – białko folistatyno-podobne (ang. *Follistatin-like protein*), G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), Gdf – czynnik wzrostu i różnicowania (ang. *Growth/differentiation factor*), IGF – insulino-podobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-Like Growth Factor*), IGFBP – białko wiążące IGF (ang. *IGF Binding Protein*), IL – interleukina (ang. *Interleukin*), LTBP – latentne białko wiążące TGF-β (ang. *Latent TGF-β-Binding Protein*), MCK – mięśniowa kinaza kreatynowa (ang. *Muscle Creatine Kinase*), MRF – miogenny czynnik regulatorowy (ang. *Myogenic Regulatory Factor*), MyHC – łańcuch ciężki miozyny (ang. *Myosin Heavy Chain*), OGN – osteoglicyna (ang. *Osteoglycin*), PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*), Prx – peroksyredoksyna (ang. *Peroxyredoxin*), Sema – semaforyna (ang. *Semaphorin*), SPARC – białko sekrecyjne bogate w cysteinę (ang. *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (ang. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*), TGF-β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. *Transforming Growth Factor β*), TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *Tumor Necrosis Factor α*)

MIĘŚNIE SZKIELETOWE JAKO NARZĄD WYDZIELANIA WEWNĘTRZNEGO

Mięśnie szkieletowe zapewniają lokomocję organizmu i wytwarzanie ciepła, odgrywają również istotną rolę w utrzymaniu homeostazy metabolicznej. Jest to główna tkanka wrażliwa na insulinę, zatem osłabienie dokomórkowego transportu glukozy i przemian lipidów w mięśniach szkieletowych są objawami insulinooporności towarzyszącej otyłości i cukrzycy typu 2. Wyniki badań ostatnich lat sugerują, że mięśnie są źródłem białek sekrecyjnych, miokin, które mają wpływ na procesy biologiczne w różnych tkankach. Regularne ćwiczenia fizyczne wywierają wiele korzystnych efektów w organizmie, m. in. poprawiają wrażliwość na insulinę, metabolizm, ciśnienie krwi i zmniejszają stan zapalny. Znana jest zależność pomiędzy niską aktywnością fizyczną a rozwojem cukrzycy typu 2, otyłości, chorób układu krążenia, zespołu metabolicznego i chorób psychicznych [40]. Powstała koncepcja, zgodnie z którą mięśnie szkieletowe, poprzez cząsteczki wydzielnicze, mogą oddziaływać na homeostazę całego organizmu w sposób autokrynny, parakrynny i/lub endokrynny.

Uznanie mięśni szkieletowych za narząd wydzielania wewnętrznego ma swoje źródło w wynikach badań, w których zidentyfikowano ekspresję i sekrecję interleukiny 6 (IL-6) w pracujących mięśniach. Poziom IL-6 pochodzenia mięśniowego w krwi wzrasta w odpowiedzi na aktywność fizyczną organizmu [39], a cytokina ta działa miejscowo i ogólnoustrojowo, zwiększając utlenianie lipidów w mięśniach [3], indukując lipolizę w tkance tłuszczowej [38] oraz modyfikując ekspresję genów kodujących enzymy glukoneogenezy w wątrobie [1]. Oprócz IL-6 w mięśniach szkieletowych wykryto syntezę i sekrecję innych białek, takich jak IL-8 i IL-15 [39], insulinopodobne czynniki wzrostu, IGF [37], transformujące czynniki wzrostu, TGF, dekorynę [29], aktywator plazminogenu [36], kolagenazę [27], czynnik wzrostu po-

chodzący z komórek glejowych [17], meltrynę α [9], musklinę [35], IL-1β [47], IL-7 [20], folistatyno-podobne białko-1, Fstl-1 [13], białko sekrecyjne bogate w cysteinę, SPARC [25] oraz czynnik wzrostu fibroblastów FGF-21, zaangażowany w procesy wzrostu naczyń krwionośnych [23].

ROLA CZYNNIKÓW WYDZIELANYCH PRZEZ KOMÓRKI MIOGENNE W REGULACJI MIOGENEZY

Miogeneza jest uznanym modelem w badaniach różnicowania komórkowego, które doprowadziły do wielu odkryć dotyczących molekularnej kontroli aktywacji genów swoistych tkankowo. W czasie różnicowania miogennego jednojądrzaste mioblasty początkowo podlegają proliferacji, następnie wycofują się z cyklu komórkowego, migrują i łączą, tworząc wielojądrzaste miotuby [7]. Na poziomie molekularnym, każdy z tych etapów jest regulowany przez wewnątrzkomórkowe przekaźniki sygnałów i czynniki transkrypcyjne. Miogenne czynniki regulatorowe takie, jak MyoD, Myf5, miogenina, i MRF4 są niezbędne do ukierunkowania linii komórkowej mioblastów oraz, poprzez współdziałanie z innymi regulatorami transkrypcji, do wzbudzenia ekspresji genów swoistych dla mięśni, kodujących łańcuch ciężki miozyny i mięśniową kinazę kreatynową [10, 53]. Miogeneza regeneracyjna u dorosłych osobników jest zależna od obecnych w mięśniach komórek progenitorowych, zwanych komórkami satelitowymi i stanowi odtworzenie miogenezy zarodkowej [26, 50]. Komórki satelitowe pozostające normalnie w stanie spoczynku, proliferują w odpowiedzi na uszkodzenie mięśnia, a mioblasty potomne różnicują się w miocyty zdolne do fuzji z istniejącymi włóknami mięśniowymi, co prowadzi do przywrócenia właściwej struktury tkanki.

Hodowle mioblastów oraz ustalone linie komórkowe (np. mysie mioblasty linii C2C12) stanowią ugruntowane i powtarzalne modele badawcze miogenezy *in vitro*, umożliwiające śledzenie zjawisk związanych z różnicowaniem komórek miogennych. Komórki te są utrzymywane w stanie proliferacji przy ciągłym zaopatrywaniu w pożywkę wzrostową, lub mogą być indukowane do różnicowania się, o czym świadczy zwiększona synteza inhibitora cyklu komórkowego p21, oraz markerów wczesnej (miogenina) i późnej miogenezy (MyHC) [14, 15, 22, 57, 58].

Znaczenie miokin i innych czynników pochodzących z mięśni szkieletowych w regulacji wzrostu i rozwoju tej tkanki jest przedmiotem intensywnych badań. Rozwój kompleksowej analizy ilościowej sekretomu komórek mięśniowych, obserwowany w ostatnich latach zapewnia pełniejszy wgląd w oddziaływania auto- i parakrynne w tkance mięśniowej. Niedawno dwa niezależne zespoły badawcze przeprowadziły prace, w których zastosowano znakowanie komórek w hodowli stabilnymi izotopami argininy i lizyny (ang. *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*, SILAC) oraz proteomikę ilościową. Henningsen i wsp. zidentyfikowe

ali 635 białek wydzielanych przez mioblasty, co stanowi największy zbiór zgromadzonych dotychczas danych dotyczących sekretomu mięśni szkieletowych, określono również ilościowo sekrecję 624 białek podczas miogenezy [22]. Inne badania, którym poddano mysie miocyty pierwotne w hodowli pozwoliły zidentyfikować liczne chemokiny i ich receptory [15], których ekspresja wydaje się kluczowa w regulacji migracji i fuzji miocytów. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowanie sekretomu mięśniowego podczas miogenezy, co sugeruje jego dynamiczną regulację i udział w rozwoju mięśni szkieletowych poprzez mechanizmy autokrynne lub parakrynne.

Ge i wsp. w swoich badaniach aktywności wydzielniczej mioblastów i potencjalnej roli cytokin w miogenezie wykorzystali strategię RNAi do zablokowania ekspresji 134 genów kodujących cytokiny [12]. Zmodyfikowane komórki indukowano do różnicowania, a po trzech dniach barwiono immunofluorescencyjnie na obecność łańcuchów ciężkich miozyny oraz jąder komórkowych przy pomocy barwnika DAPI (ang. *Diamidino-2-Phenylindole*). W przygotowanych preparatach oceniano wskaźniki postępu miogenezy takie, jak: indeks różnicowania (odsetek miocytów przejawiających ekspresję łańcucha ciężkiego miozyny), indeks fuzji (odsetek jąder komórkowych w miotubach przejawiających ekspresję łańcucha ciężkiego miozyny) oraz wielkość miotub (średnią liczbę jąder komórkowych w miotubach). Zidentyfikowano 29 czynników zaangażowanych w regulację miogenezy i zaliczono je do czterech kategorii, obejmujących interleukiny, czynniki związane z TNF i chemokiny z podrodzin CC i CXC. Większość czynników stanowiły negatywne regulatory miogenezy, co może być związane z utrzymaniem puli niezróżnicowanych komórek i zapewnieniem potencjału regeneracyjnego tkanki mięśniowej.

CYTOKINY KONTROLUJĄCE INICJACJĘ RÓŻNICOWANIA MIOGENNEGO

Ccl8, Cxcl9, Flt3l i Tnfsf14 okazały się kluczowe w regulacji wczesnych etapów miogenezy, ponieważ „knockdown" ich genów spowodował obniżenie wszystkich badanych wskaźników różnicowania [12]. Mechanizm działania tych czynników w kontroli miogenezy nie jest dokładnie znany, dotychczas opisano ich rolę w odpowiedzi immunologicznej, np. Cxcl9 jest jednym z trzech ligandów receptora CXCR3 indukowanych przez interferon-γ [16].

Angiopoetyna-1 (ANGPT-1) i angiopoetyna-2 (ANGPT-2) modulują przeżywalność i różnicowanie komórek śródbłonka [4], istnieją jednak dowody na ekspresję tych białek w komórkach mięśni gładkich i kardiomiocytach. Ostatnie badania wykazały, że angiopoetyna-1 i -2 podlegają ekspresji w ludzkich i mysich mioblastach pierwotnych [32]. Synteza i wydzielanie ANGPT-2 wzrastały istotnie w czasie różnicowania mioblastów w miotuby. Dalsze badania ujawniły pozytyw-

ny wpływ angiopoetyny-2 na przeżywalność mioblastów i stymulację różnicowania, ocenianą na podstawie wskaźników wczesnej (MyoD, miogenina) i późnej miogenezy (MyHC, MCK).

G-CSF pierwotnie opisano jako czynnik o działaniu hemopoetycznym i stosowano w badaniach podstawowych i klinicznych do pobudzenia podziałów i różnicowania komórek macierzystych krwi [31]. Badania ostatnich lat wykazały udział tej cytokiny w regulacji przeżywalności, proliferacji i różnicowania komórek [60] oraz ekspresję jej receptora w kardiomiocytach [48]. Powyższe obserwacje zachęciły zespół Hara i wsp. do zbadania udziału G-CSF w różnicowaniu miogennym [18]. Okazało się, że G-CSF i jego swoisty receptor (G-CSFR) podlegają ekspresji w komórkach miogennych, a ich synteza jest zbieżna w czasie ze spadkiem ekspresji Pax-3 i Pax-7, markerów komórek satelitowych, oraz wzrostem ekspresji czynników transkrypcyjnych, MyoD i miogeniny. W komórkach przejawiających ekspresję G-CSF i G-CSFR stwierdzono również obecność desminy, białka filamentów pośrednich w mięśniach szkieletowych. Na podstawie tych obserwacji wysnuto wniosek, że G-CSF bierze udział w autokrynnej regulacji wczesnych etapów różnicowania miogennego [18].

HUMORALNA REGULACJA MIGRACJI I FUZJI KOMÓREK MIOGENNYCH

Migracja ma decydujące znaczenie w adhezji komórek, niezbędnej do różnicowania, oraz tworzenia i wzrostu miotub [56]. Chemokiny, kontrolujące migrację komórek odpornościowych i nowotworowych w trakcie tworzenia przerzutów [2, 33] odgrywają ważną rolę w migracji mięśniowych komórek prekursorowych podczas miogenezy zarodkowej [24] i w przenikaniu makrofagów do uszkodzonej tkanki mięśniowej [28].

W badaniach mających na celu szczegółową analizę aktywności migracyjnej komórek mięśniowych podczas miogenezy [15], zastosowano czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) i płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), znane chemoatraktanty mioblastów [56]. Zarówno HGF jak i PDGF znacznie zwiększały migrację mioblastów, jednak żaden z tych czynników nie pobudził migracji miocytów, a przyczyną obserwowanych różnic były zmiany ekspresji receptorów towarzyszące różnicowaniu komórek. Po indukcji miogenezy wykryto wzrost 80 różnych rodzajów mRNA dla chemokin i receptorów chemokin w komórkach mięśniowych, przy czym większość tych czynników (aż 52) podlegała nasilonej ekspresji w okresie fuzji miocytów [15].

Do cytokin kontrolujących fuzję komórek miogennych należą również: IL-4, syntetyzowana podczas miogenezy *in vitro* i *in vivo* [15, 42], Cxcl12, czynnik wzrostu i różnicowania Gdf15, zaliczany do nadrodziny TGFβ, zaangażowany w erytropoezę [51], oraz Scgb3a1 [12]. Mechanizm pro-miogennego działania Gdf15

i Scgb3a1 jest nieznany, jednak hamowanie ekspresji tych genów w mioblastach C2C12 skutkowało pojawieniem się miotub o owalnym kształcie, co świadczy o nieprawidłowym przebiegu fuzji komórek i wydłużania włókien mięśniowych.

CYTOKINY HAMUJĄCE RÓŻNICOWANIE

Większość cytokin podlegających ekspresji w różnicujących mioblastach wykazuje hamujące działanie na miogenezę [12]. Za przykład może posłużyć Cxcl10, ponieważ „knockdown" genu kodującego tę chemokinę spowodował wzrost indeksu różnicowania, indeksu fuzji i wielkości tworzonych miotub. Cxcl10 wykazuje powinowactwo do CXCR3, tego samego receptora, co Cxcl9 [16], wywierająca pozytywny wpływ na różnicowanie. Prawdopodobnie, zależności pomiędzy różnymi chemokinami obserwowane w reakcjach zapalnych, obejmujące podobieństwo ich efektów, synergizm i antagonizm, dotyczą również regulacji miogenezy.

TNF-α, cytokina prozapalna, uwalniania przez komórki układu odpornościowego w miejscu uszkodzenia mięśnia szkieletowego, podlega ekspresji w różnicujących mioblastach i hamuje miogenezę [12, 57].

Różnicujące ludzkie komórki satelitowe wydzielają do pożywki inkubacyjnej IL-7 [20]. Wzrost syntezy tej cytokiny w czasie różnicowania stwierdzono na poziomie mRNA i białka, towarzyszył mu jednak spadek ekspresji receptora dla IL-7. Dalsze badania, w których zastosowano rekombinowaną IL-7 ujawniły potencjalną funkcję tej cytokiny w miogenezie: okazało się, że IL-7 pobudza migrację komórek satelitowych, jednak hamuje ich różnicowanie w miotuby, wyrażone syntezą MyHC [20]. Na podstawie tych obserwacji wysnuto wniosek, że IL-7 na drodze autokrynnej pobudza wczesne etapy miogenezy, jednak hamuje rozwój fenotypu włókna mięśniowego.

Wśród cytokin, które sklasyfikowano jako negatywne regulatory miogenezy znalazły się ponadto: Gdf3, IL-5, IL-17, IL-18, IL-21, Ccl17 i Ccl9 [12]. Dokładny mechanizm ich działania w procesie wzrostu i homeostazy mięśni szkieletowych wymaga dalszych badań.

AKTYWNOŚĆ WYDZIELNICZA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH W CZASIE MIOGENEZY

Henningsen i wsp. wykazali, że 188 spośród 624 zidentyfikowanych białek sekrecyjnych podlega odmiennej regulacji w proliferujących i różnicujących się mioblastach [22]. Białka poddano nienadzorowanej klasyfikacji zgodnie z przebiegiem zmian ich sekrecji i otrzymano kilka odrębnych profili dynamicznych. Więk-

szość zidentyfikowanych białek wykazywała zwiększony poziom sekrecji w miarę postępu różnicowania, co sugeruje, że dojrzewaniu komórek mięśni szkieletowych towarzyszy ogólna zwiększona aktywność wydzielnicza.

BIAŁKA WYDZIELNICZE PODLEGAJĄCE ZMIENNEJ EKSPRESJI W CZASIE MIOGENEZY

Po indukcji różnicowania mioblastów C2C12 stwierdzono pobudzenie ekspresji kilku białek sekrecyjnych klasyfikowanych jako negatywne regulatory proliferacji komórkowej [22]. Zaobserwowano również wzrost ekspresji czynników kontrolujących adhezję komórek i strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białek, które odgrywają rolę w różnych procesach metabolicznych, morfogenezie narządów, rozwoju naczyń krwionośnych i układu nerwowego.

Zidentyfikowano trzy izoformy TGF-β (TGF-β1, -β2 i -β3) wydzielane podczas miogennego różnicowania [22]. Zaobserwowano wyraźny wzrost ich wydzielania, co pozostaje w pozornej sprzeczności z ogólnie uznaną rolą czynników TGF-β jako inhibitorów różnicowania mięśni szkieletowych [46] i odzwierciedla złożoność ścieżki sygnałowej TGF-β w programie miogennym. Inne badania potwierdziły ekspresję TGF-β w mięśniach szkieletowych podczas miogenezy i regeneracji [11, 59]. Zwiększone wydzielanie nie jest równoznaczne ze wzrostem poziomu biologicznie czynnego TGF-β, ponieważ aktywność ścieżki sygnałowej tego czynnika jest regulowana m. in. poprzez sekwestrację w macierzy zewnątrzkomórkowej przez latentne białka wiążące TGF-β (LTBP). Stwierdzono, że wszystkie cztery białka LTBP ulegają sekrecji w kulturze komórek C2C12: sekrecja LTBP-1, LTBP-2 i LTBP-4 nie podlegala znacznym zmianom podczas miogenezy, podczas gdy wydzielanie LTBP-3 było wyraźnie zwiększone [22]. Funkcje poszczególnych LTBP w miogenezie wymagają wyjaśnienia, prawdopodobnie, odgrywają one ważną rolę w stabilizacji TGF-β uwalnianego z mięśni i działającego na inne tkanki docelowe na drodze endokrynnej. Oprócz LTBP zidentyfikowano także inne białka modulujące aktywność TGF-β charakteryzujące się zróżnicowanym profilem sekrecji podczas różnicowania, takie jak proteoglikany, dekoryna i biglikan [29]. Wzrost ich wydzielania obserwowany w czasie różnicowania może zmniejszać biodostępność TGF-β podczas miogenezy.

Insulinopodobne czynniki wzrostu, które pobudzają różnicowanie [34] i odgrywają znaczącą rolę w homeostazie metabolicznej mięśni szkieletowych [43], charakteryzuje zwiększony poziom sekrecji w miogenezie. Sekrecja IGF-2 wzrasta znacząco podczas różnicowania, potwierdzając istotną rolę regulacyjną tego czynnika w miogenezie. Natomiast najwyższy poziom wydzielanego IGF-1 obserwowano w 2. dniu różnicowania, co sugeruje, że jest on ważnym modulatorem pro-

cesów komórkowych w początkowych etapach różnicowania [22]. W tym samym badaniu zidentyfikowano pięć białek wiążących IGF (ang. *IGF Binding Protein*, IGFBP): IGFBP-2, -4, -5, -6 i -7, wydzielanych przez komórki C2C12. Poziom wydzielanego IGFBP-2 istotnie obniżał się podczas różnicowania, ekspresja IGFBP-4 wykazała tendencję wzrostową, natomiast sekrecja IGFBP-5, -6 i -7 nie podlegała znaczącym zmianom w miarę postępu miogenezy [22].

Semaforyny, początkowo opisywane jako elementy systemu regulującego kierowanie aksonów podczas rozwoju układu nerwowego, obecnie uznaje się za ważne modulatory angiogenezy, organogenezy, rozwoju guza i odpowiedzi immunologicznej [45]. U ssaków rodzina semaforyn składa się z pięciu podklas obejmujących białka wydzielnicze (Sema3A-G), przezbłonowe (Sema4A-G, Sema5A-B, Sema6A -D) i związane z fosfatydyloinozytolem (Sema7A). Ostatnie badania wskazują, że niektóre semaforyny odgrywają ważną rolę w regulacji rozwoju mięśni szkieletowych [52]. Mioblasty i zróżnicowane miotuby wydzielają cztery białka podrodziny Sema3 (Sema3A, B, D i E), dwa z podrodziny Sema4 (Sema4B i C) oraz Sema6A i Sema7A [22]. Badanie ekspresji techniką PCR w czasie rzeczywistym wskazało, że poziom wydzielanych semaforyn jest regulowany przez mechanizmy potranskrypcyjne, potranslacyjne oraz na drodze sekrecji i/lub modyfikacje uwalnianych białek. Wysoki poziom wydzielanych Sema3A, 3E i 6A obserwowany w 2. dniu różnicowania sugeruje, że mogą one działać w sposób autokrynny regulując wczesne zdarzenia podczas różnicowania, podczas gdy Sema7A odgrywa rolę podczas wczesnych i późnych etapów miogenezy. Wysunięto hipotezę, że zwiększona ekspresja Sema3A obserwowana w komórkach satelitowych w czasie naprawy mięśni pełni funkcję parakrynną w regulacji regeneracji unerwienia mięśni [52]. Obniżona ekspresja Sema6C w odnerwionych mięśniach szkieletowych, świadczy o tym, że również inne klasy semaforyn są zaangażowane w neurogenezę w mięśniach [62].

Jednym z czynników, których ekspresja zmniejsza się podczas miogenezy jest folistatyno-podobne białko-1 (Fstl-1) [6]. Wyciszenie genu *Fstl-1* metodą siRNA zmniejszało transkrypcję mięśniowej kinazy kreatynowej, którą w badaniach wykorzystano jako marker różnicowania miogennego. Fstl-1 występuje obficiej w mioblastach niż miotubach, zasugerowano zatem, że uczestniczy ono we wczesnych fazach miogenezy, takich jak opuszczenie cyklu komórkowego i/lub migracja komórek [6]. Podobne działanie Fstl-1 udokumentowano dotychczas w innych modelach badawczych, takich jak komórki śródbłonka i raka błony śluzowej trzonu macicy [8].

Innym czynnikiem, którego ekspresja podlega hamowaniu podczas miogenezy, jest osteoglicyna, OGN [6], składnik macierzy zewnątrzkomórkowej należący do rodziny małych proteoglikanów bogatych w leucynę. Ważną rolą przypisywaną osteoglicynie jest pobudzanie wzrostu tkanki kostnej, przejawiające się podwyższeniem poziomu fosfatazy zasadowej, kolagenu typu I, osteokalcyny, β-kateniny i mineralizacją w hodowli osteoblastów [49]. Wyciszenie ekspresji OGN obniża transkrypcję MCK [6]. Wyniki te rzucają nowe światło na rolę OGN, która jest nie

tylko czynnikiem anabolicznym dla tkanki kostnej, ale może również wpływać na wczesne etapy miogenezy.

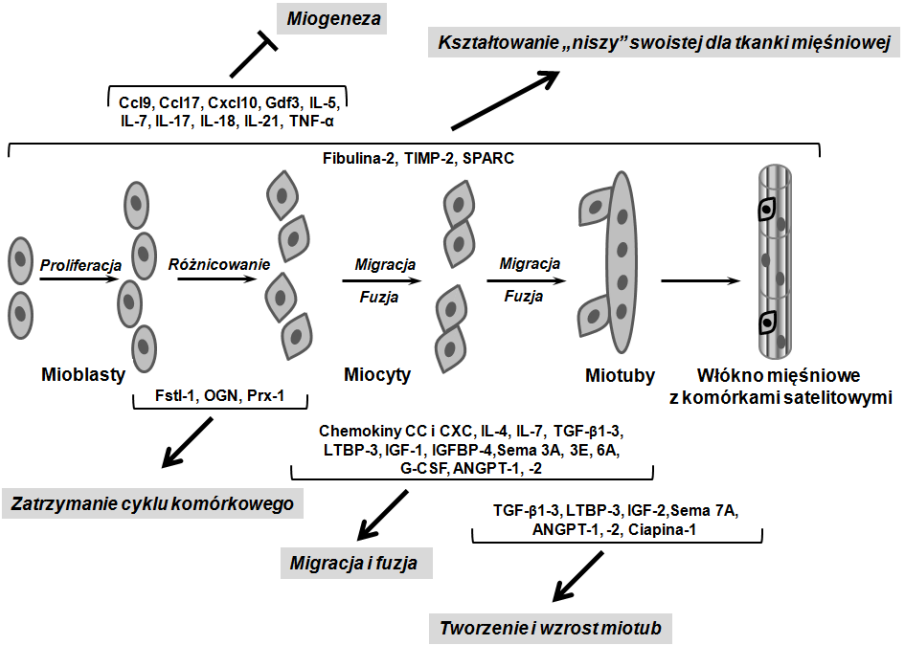
Peroksyredoksyna-1 (Prx-1) jest kolejnym białkiem, którego stężenie zmniejsza się podczas miogenezy [6], kontrolującym cykl komórkowy poprzez interakcje z protoonkogenami c-Myc i c-Abl. Wycofanie się z cyklu komórkowego jest niezbędnym warunkiem różnicowania się mioblastów i obniżenie poziomu czynników wydzielniczych, które pobudzają podział komórek decyduje o postępie miogenezy.

Ciapina-1 występuje wyłącznie w miotubach, jej synteza zwiększa się podczas miogenezy, jednak wyciszenie ekspresji tego genu nie zmienia znacząco poziomu kinazy keratynowej [6]. Częściowo może to być związane z obecnością innych aktywnych czynników, które kompensują utratę ciapiny-1 i w ten sposób utrzymują ekspresję MCK [6]. Znaczna ilość ciapiny-1 obserwowana na późniejszych etapach miogenezy (tj. w miotubach) wskazuje na rolę tego białka w utrzymywaniu populacji spoczynkowych mięśniowych komórek satelitowych, które decydują o regeneracji mięśni w okresie pourodzeniowym [44]. Wykazano, że ciapina-1 hamuje proliferację komórek gruczolakoraka nerki poprzez zatrzymywanie komórek nowotworowych w fazie G1/S cyklu komórkowego [21]. Antyproliferacyjny wpływ ciapiny-1, wspomagający przeżycie komórek satelitowych w warunkach *in vivo*, może mieć terapeutyczne znaczenie w przypadku różnych stanów związanych z wyniszczeniem mięśni, dystrofii mięśniowej Duchenne'a i kacheksji.

BIAŁKA WYDZIELNICZE WYKAZUJĄCE STAŁĄ EKSPRESJĘ W CZASIE MIOGENEZY

Przykładem czynnika, którego ekspresja nie zmienia się znacząco podczas miogenezy jest fibulina-2, białko o 1195 resztach aminokwasowych, poprzedzonych przez 26-aminokwasowy peptyd sygnałowy, która występuje głównie w błonach podstawnych. Fibulina-2 ulega wzmożonej ekspresji w tkance mięśniowej serca w czasie rozwoju i po doświadczalnie wywołanym zawale mięśnia sercowego [54]. Według ostatnich badań działanie fibuliny-2 w kardiomiocytach polega na modulowaniu szlaku sygnałowego wzbudzonego przez TGF-β [61]. Stałą ekspresję fibuliny obserwowano zarówno w mioblastach, jak i miotubach [6]. Niski poziom transkrypcji mięśniowej kinazy kreatynowej po wyciszeniu ekspresji fibuliny 2 pozwala przypuszczać, że czynnik ten jest niezbędny w migracji komórek i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej w prawidłowym przebiegu miogenezy.

TIMP-2 jest tkankowym inhibitorem metaloproteinaz macierzy (MMP), endopeptydaz zależnych od cynku, odpowiedzialnych za uwalnianie czynników wzrostu z macierzy zewnątrzkomórkowej i za dostępność ich receptorów [5]. MMP powodują degradację składników macierzy, co ułatwia przebudowę tkanki i migrację komórek [28, 55]. Stwierdzono, że nadekspresja TIMP-2 zmniejsza ekspresję mioge-



RYCINA 1. Schemat przedstawiający zmiany aktywności sekrecyjnej różnicujących się komórek miogennych, uwzględniający udokumentowaną lub potencjalną rolę wydzielanych białek w regulacji miogenezy. Zaznaczono najważniejsze etapy miogenezy takie jak: proliferacja mioblastów, ich różnicowanie się, fuzja i tworzenie miotub, oraz dojrzałe włókna mięśniowe, którym towarzyszą uśpione komórki satelitowe, biorące udział w regeneracji mięśni. Skróty: ANGPT – angiopoetyna, Ccl – chemokina z podrodziny CC, Cxcl – chemokina z podrodziny CXC, Fstl – białko folistatyno-podobne, G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, Gdf – czynnik wzrostu i różnicowania (growth/differentiation factor), IGF – insulino-podobny czynnik wzrostu, IGFBP – białko wiążące insulino-podobny czynnik wzrostu, IL – interleukina, LTBP – latentne białko wiążące TGF-β, OGN – osteoglicyna, Prx – peroksyredoksyna, Sema – semaforyna, SPARC - białko sekrecyjne bogate w cysteinę, TGF-β – transformujący czynnik wzrostu β, TIMP - tkankowy inhibitor metaloproteinaz, TNF -α – czynnik martwicy nowotworu-α; ⟶ oznacza stymulację, ⊣ oznacza hamowanie. Klamry [oznaczają etap miogenezy, któremu towarzyszy wzrost wydzielania danej grupy czynników

FIGURE 1. Schematic representation of the changes in secretion activity of myogenic cells during differentiation. The schema was designed on the basis of documented or potential role of the secreted proteins in regulation of skeletal myogenesis. The most important stages of myogenesis, i.e. myoblast proliferation, differentiation, myocyte fusion and myotube formation, and mature muscle fibers accompanied by quiescent satellite cells are indicated. Abbreviations: ANGPT – Angiopoietin, Ccl – CC chemokine, Cxcl – CXC chemokine, Fstl – Follistatin-like protein, G-CSF – Granulocyte-colony stimulating factor, Gdf – Growth/differentiation factor, IGF – Insulin-like growth factor, IGFBP – IGF binding protein, IL – Interleukin, LTBP – Latent TGF-β binding protein, OGN – Osteoglycin, Prx – Peroxyredoxin, Sema – Semaphorin, SPARC – Secreted protein acidic and rich in cysteine, TGF-β – Transforming growth factor β, TIMP – Tissue inhibitor of metalloproteinase, TNF-α – Tumor necrosis factor α. ⟶ indicates activation, ⊣ indicates inhibition. [indicates the stage of myogenesis accompanied by increased secretion of particular group of factors

niny, co oznacza, że TIMP-2 pełni funkcję negatywnego regulatora miogenezy [30]. Jest to zgodne z obserwacjami wskazującymi, że wyciszenie TIMP-2 powoduje wzrost transkrypcji MCK. Co ciekawe, w mysim promotorze TIMP-2 istnieją liczne sekwencje E-box, co nasuwa przypuszczenie, że ekspresja TIMP-2 może podlegać negatywnej regulacji przez MRF w trakcie realizacji programu miogennego [6].

Białko SPARC, znane również jako osteonektyna lub BM-40 jest wielofunkcyjną cząsteczką o masie ok. 43 kDa, związaną z macierzą pozakomórkową. SPARC swoiście wiąże różne elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, kontrolując interakcje komórka-macierz, organizację tkanki łącznej i błon podstawnych [19]. Wzrost ekspresji SPARC w czasie regeneracji mięśni szkieletowych wskazuje na istotną rolę tego białka w procesach naprawczych [41]. Ekspresja SPARC ma miejsce zarówno w proliferujących mioblastach satelitowych jak i zróżnicowanych miotubach i włóknach mięśniowych, co przemawia za znaczeniem tego białka w kształtowaniu „niszy" swoistej dla tkanki mięśniowej [25]. Zmiany aktywności wydzielniczej komórek na różnych etapach miogenezy oraz potencjalne znaczenie uwalnianych czynników w regulacji różnicowania miogennego przedstawiono na ryc. 1.

ZNACZENIE BADAŃ AKTYWNOŚCI SEKRECYJNEJ MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Interakcje pomiędzy tkankami zachodzące dzięki cząsteczkom sygnałowym, koordynują główne procesy komórkowe, takie jak wzrost, różnicowanie i przeżycie komórek. Białka wydzielane przez mięśnie szkieletowe wykazują działanie miejscowe w tej tkance, oraz ogólnoustrojowe, na inne narządy, takie jak mózg, tkanka tłuszczowa i wątroba [35]. Mięśnie są największą tkanką w organizmie, jednak ich rola jako czynnego narządu wydzielania wewnętrznego została odkryta niedawno. Od tego czasu prowadzone są badania mające na celu szczegółowe poznanie sekretomu mięśni, a różnorodność zidentyfikowanych do tej pory białek wydzielniczych pochodzenia mięśniowego sugeruje mnogość procesów, które są w ten sposób kontrolowane. Zidentyfikowane czynniki pełnią różne funkcje molekularne, wykazując aktywność czynników wzrostu, cytokin, enzymów i składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz biorą udział w regulacji różnych procesów komórkowych, takich jak angiogeneza, neurogeneza i odpowiedź zapalna. Odkrycie roli chemokin i ich receptorów w miogenezie oraz modulowanie ich wzajemnych oddziaływań w rozwoju mięśni szkieletowych jest cenne dla poszukiwania nowych strategii w terapii chorób mięśni, charakteryzujących się zanikiem i osłabioną regeneracją tej tkanki. Poznanie białek sekrecyjnych mięśni szkieletowych przejawiających działanie ogólnoustrojowe, jest istotne dla rozwoju strategii terapeutycznych w zaburzeniach metabolicznych.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana ze środków Katedry Nauk Fizjologicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

LITERATURA

[1] Banzet S, Koulmann N, Simler N, Sanchez H, Chapot R, Serrurier B, Peinnequin A, Bigard X. Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA. J Appl Physiol 2009; **107**: 1830-1839.

[2] Bosisio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. Chem. Immunol Allergy 2014; **99**: 89-104.

[3] Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. J Biomed Biotechnol 2010; doi:10.1155/2010/520258.

[4] Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. Circ Res 2006; **98**: 1014-1023.

[5] Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. Muscle Nerve 2004; **29**: 191-197.

[6] Chan CY, Masui O, Krakovska O, Belozerov VE, Voisin S, Ghanny S, Chen J, Moyez D, Zhu P, Evans KR, Mcdermott JC, Siu KW. Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. Mol Cell Proteom 2011; DOI 10.1074/mcp.M110.004804.

[7] Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev 2004; **84**: 209-238.

[8] Chan QK, Ngan HY, Ip PP, Liu VW, Xue WC, Cheung AN. Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis: a differential expression and functional analysis. Carcinogenesis 2009; **30**: 114-121.

[9] Ettinger K, Lecht S, Arien-Zakay H, Cohen G, Aga-Mizrachi S, Yanay N, Saragovi HU, Nedev H, Marcinkiewicz C, Nevo Y, Lazarovici P. Nerve growth factor stimulation of ERK1/2 phosphorylation requires both p75NTR and α9β1 integrin and confers myoprotection towards ischemia in C2C12 skeletal muscle cell model. Cell Signal 2012; **24**: 2378-2388.

[10] Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'emilio A, Biagiotti L, Del Grande P, De Luca A, Stocchi V, Falcieri E. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. J Cell Biochem 2009; **108**: 1302-1317.

[11] Furutani Y, Umemoto T, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Role of endogenous TGF-b family in myogenic differentiation of C2C12 cells. J Cell Biochem 2011; **112**: 614-624.

[12] Ge Y, Waldemer RJ, Nalluri R, Nuzzi PD, Chen J. RNAi screen reveals potentially novel roles of cytokines in myoblast differentiation. PLoS ONE 2013; **8**(7): e68068. doi:10.1371/journal.pone.0068068.

[13] Gorgens SW, Raschke S, Holven KB, Jensen J, Eckardt K, Eckel J. Regulation of follistatin-like protein 1 expression and secretion in primary human skeletal muscle cells. Arch Physiol Biochem 2013; **119**: 75-80.

[14] Grabiec K, Gajewska M, Milewska M, Błaszczyk M, Grzelkowska-Kowalczyk K. The influence of high glucose and high insulin on mechanisms controlling cell cycle progression and arrest in mouse C2C12 myoblasts: the comparison with IGF-I effect. J Endocrinol Invest 2014; **37**: 233-245.

[15] Griffin CA, Apponi LH, Long KK, Pavlath GK. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. J Cell Sci 2010; **123**: 3052-3060.

[16] Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. Immunol Cell Biol 2011; **89**: 207-215.
[17] Gyorkos AM, Mccullough MJ, Spitsbergen JM. Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) expression and NMJ plasticity in skeletal muscle following endurance exercise. Neuroscience 2014; **257**: 111-118.
[18] Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N et al. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. J Exp Med 2011; **208**: 715-727.
[19] Harris BS, Zhang Y, Card L, Rivera LB, Brekken RA, Bradshaw AD. SPARC regulates collagen interaction with cardiac fibroblast cell surfaces. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011; **301**: H841-H847.
[20] Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skålhegg BS, Raastad T, Drevon CA. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 2010; **298**: C807-16.
[21] He L, Wang H, Jin H, Guo C, Xie H, Yan K, Li X, Shen Q, Qiao T, Chen G, Chai N, Zhao L, Dong Q, Zheng Y, Liu J, Fan D. CIAPIN1 inhibits the growth and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. Cancer Lett 2009; **276**: 88-94.
[22] Henningsen J, Rigbolt KT, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. Mol Cell Proteom 2010; **9**: 2482-2496.
[23] Hojman P, Pedersen M, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen S, Pedersen BK. Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. Diabetes 2009; **58**: 2797-2801.
[24] Iwasaki S, Miyake M, Hayashi S, Watanabe H, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Aso H. Effect of myostatin on chemokine expression In regenerating skeletal muscle cells. Cell Tissues Organs 2013; **198**: 66-74.
[25] Jørgensen LH, Petersson SJ, Sellathurai J, Andersen DC, Thayssen S, Sant DJ, Jensen CH, Schrøder HD. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in human skeletal muscle. J Histochem Cytochem 2009; **57**: 29-39.
[26] Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. In Vivo 2009; **23**:779-96.
[27] Lei H, Leong D, Smith LR, Barton ER. Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. Am J Physiol Cell Physiol 2013; **305**: C529-C538.
[28] Lesault PF, Theret M, Magnan M, Cuvellier S, Niu Y, Gherardi RK, Tremblay JP, Hittinger L, Chazaud B. Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cells into mdx skeletal muscle. PLoS ONE 2012; **7**(10): e46698. doi:10.1371/journal.pone.0046698.
[29] Li X, Velleman SG. Effect of transforming growth factor-beta1 on decorin expression and muscle morphology during chicken embryonic and posthatch growth and development. Poultry Sci 2009; **88**: 387-397.
[30] Liu H, Chen SE, Jin B, Carson JA, Niu A, Durham W, Lai JY, Li YP. TIMP-3: a physiological regug lator of adult myogenesis. J Cell Sci 2010; **123**: 2914-2921.
[31] Metcalf D. Hematopoietic cytokines. Blood. 2008; **111**: 485-491.
[32] Mofarrahi M, Hussain SNA. Expression and functional roles of angiopoietin-2 in skeletal muscles. PLoS ONE 2011; **6**(7): e22882. doi:10.1371/journal.pone.0022882.
[33] Mohamed MM, El-Ghonaimy EA, Nouh MA, Achneider RJ, Sloane BF, El-Shinawi M. Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties. Int J Biochem Cell Biol 2014; **46**: 138-147.
[34] Mourkioti F, Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. Trends Immunol 2005; **26**: 535-542.
[35] Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. J Biol Chem 2004; **279**: 19391-19395.

[36] Novak ML, Bryer SC, Cheng M, Nguyen MH, Conley KL, Cunningham AK, Xue B, Sisson TH, You J-S, Hornberger TA, Koh TJ. Macrophage-specific expression of uPA promotes skeletal muscle regeneration. J Immunol 2011; **187**: 1448-1457.
[37] Nystrom G, Pruznak A, Huber D, Frost RA, Lang CH. Local insulin-like growth factor I prevents sepsis-induced muscle atrophy. Metabolism 2009; **58**: 787-797.
[38] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived Interleukin-6. Physiol Rev 2008; 88:1379-1406.
[39] Pedersen BK. Muscles and their myokines. J. Exp. Biol. 2011; **214**(Pt 2): 337-46.
[40] Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity-and the role of myokines in muscle-fat cross talk. J Physiol 2009; **587**: 5559-5568.
[41] Petersson SJ, Jørgensen LH, Andersen DC, Nørgaard RC, Jensen CH, Schrøder HD. SPARC is up-regulated during skeletal muscle regeneration and inhibits myoblast differentiation. Histol Histopathol 2013; **28**: 1451-1460.
[42] Possidonio AC, Senna ML, Portilho DM, Pontes Soares C, Da Silva Sampaio L, Einicker-Lamas M, Castelo Branco MT, Costa ML, Mermelstein C. a-Cyclodextrin enhances myoblast fusion and muscle differentiation by the release of IL-4. Cytokine 2011; **55**: 280-287.
[43] Rajpathak SN, Gunter MJ, Wylie-Rosett J, Ho GY, Kaplan RC, Muzumdar R, Rohan TE, Strickler HD. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2009; **25**: 3-12.
[44] Rhoads RP, Fernyhough ME, Liu X, Mcfarland DC, Velleman SG, Hausman GJ, Dodson MV. Extrinsic regulation of domestic animal-derived myogenic satellite cells II. Domest Anim Endocrinol 2009; **36**: 111-126.
[45] Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Cremel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. Cell Mol Life Sci 2009; **66**: 649-666.
[46] Schabort EJ, Van Der Merwe M, Loos B, Moore FP, Niesler CU. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. Exp Cell Res 2009; **315**: 373-384.
[47] Scheler M, Imler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, Beckers J, De Angelis MH, Haring Hu, Weigert C. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. Am J Physiol Cell Physiol 2013; **305**: C877-C886.
[48] Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. Cell Stem Cell 2010; **6**: 227-237.
[49] Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Katagiri T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. J Biol Chem 2012; **287**: 11616-11628.
[50] Tanaka KK, Hall JK, Troy AA, Cornelison DD, Majka SM, Olwin BB. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. Cell Stem Cell 2009; **4**: 217-225.
[51] Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. Curr Opin Hematol 2010; **17**: 184-190.
[52] Tatsumi R, Sankoda Y, Anderson JE, Sato Y, Mizunoya W, Shimizu N, Suzuki T, Yamada M, Rhoads RP Jr, Ikeuchi Y, Allen RE. Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation. Am J Physiol Cell Physiol 2009; **297**: C238-C252.
[53] TSIVITSE S. Notch and Wnt Signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. Int J Biol Sci 2010; **6**: 268-281.
[54] Tsuda T, Wu J, Gao E, Joyce J, Markova D, Dong H, Liu Y, Zhang H, Zou Y, Gao F, Miller T, Koch W, Ma X, Chu ML. Loss of fibulin-2 protects against progressive ventricular dysfunction after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol 2012; **52**: 273-282.
[55] Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. Am J Pathol 2009; **174**: 541-549.

[56] Webster MT, Fan CM. c-Met regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. PLoS ONE 2013; **8**(11): e81757. doi:10.1371/journal.pone.0081757.
[57] Wieteska-Skrzeczyńska W, Grzelkowska-Kowalczyk K, Tokarska J, Grabiec K. Growth factor and cytokine interactions in myogenesis. Part I. The effect of TNF-α and IFN-γ on IGF-I-dependent differentiation in mouse C2C12 myogenic cells. Pol J Vet Sci 2011; **14**: 417-424.
[58] Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature 1977; **270**: 725-727.
[59] Yamagishi T, Ando K, Nakamura H, Nakajima Y. Expression of the TGFb2 gene Turing chick embryogenesis. Anat Rec (Hoboken) 2012; **295**: 257-267.
[60] Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. Cell Stem Cell 2009; **4**: 313-323.
[61] Zhang H, Wu J, Dong H, Khan SA, Chu ML, Tsuda T. Fibulin-2 deficiency attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by reducing transforming growth factor-β signalling. Cli Sci (Lond) 2014; **126**: 275-288.
[62] Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. Trends Biochem Sci 2008; **33**: 161-170.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 11.03.2014
Przyjęto: 14.05.2014
Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
tel.: (22) 593 62 31
e-mail: k_grzel_kow@poczta.fm