

Regeneracija skeletnog mišića i uloga regeneracijskih gena

Skeletal muscle regeneration and the role of regeneration genes

Gordana Starčević-Klasan^{1*}, Tina Martinčić, Marina Nikolić¹, Orijana Josipović², Stanislav Peharec³, Dragica Bobinac¹

¹Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Centar za rehabilitaciju Kozala, Rijeka

³Poliklinika za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju „Peharec“, Pula

Sažetak. Skeletni mišić odraslog organizma je dinamično tkivo koje ima iznimnu sposobnost regeneracije nakon ozljede. Radi se o sinkroniziranim procesima koji uključuju aktivaciju populacije mišićnih prekursora koje nazivamo satelitskim stanicama. Nakon povrede skeletni mišić vrlo brzo započinje s opsežnim procesima reparacije s ciljem prevencije gubitka mišićne mase. Inicijalna faza mišićne regeneracije i reparacije karakterizirana je nekrozom oštećenog tkiva i upalom. Gotovo istodobno aktiviraju se do tada mirne satelitske stanice, proliferiraju, diferenciraju i spajaju se kako bi nastalo multinuklearno mišićno vlakno. U procesu mišićne regeneracije značajnu funkciju imaju i proteini regeneracijske (Reg) genske obitelji. Obitelj Reg gena uključena je u proces regeneracije tkiva, rast i proliferaciju različitih stanica, staničnu adheziju i otpornost na apoptozu. Reg geni očituju se u ranim fazama ozljede, što upućuje na njihovu ulogu reaktanta akutne faze upale i faktora rasta koji uzrokuje proliferaciju i rast Schwannovih stanica u skeletnom mišiću, odnosno proliferaciju i rast Schwannovih stanica u ozlijeđenom perifernom živcu. Budući da se Reg 3G pojavljuje odmah nakon ozljede mišića i živca, pretpostavlja se da ima ulogu posrednika u signaliranju između ozlijeđenog živca i mišića, a moguće i makrofaga.

Ključne riječi: denervacija; regeneracija; satelitske stanice; skeletni mišić; živac

Abstract. Adult skeletal muscle is an extremely dynamic tissue which has a tremendous ability of regeneration after muscle injury. These processes are highly synchronized involving the activation of well-defined population of muscle stem cells called satellite cells. After injury skeletal muscle initiate a rapid and extensive repair process preventing the loss of muscle mass. The initial phase of muscle regeneration and repair is characterized by necrosis of the damaged tissue and inflammation. Almost simultaneously previous quiescent satellite cells are activated, proliferate, differentiate and fuse to form multinucleated myofibers. The regenerating (Reg) protein family has important role in the process of muscle regeneration. Reg proteins play important roles in tissue regeneration, cell growth and proliferation, cell adhesion and resistance to apoptosis. A Reg3G gene is upregulated in the early phase of muscle injury and acts as acute phase reactants and growth factor for muscle satellite cells and injured Schwann cells. Since the induction and release of Reg3G appeared to readily respond to muscle and nerve injury, Reg3G may function as mediators of the injury signal among the injured nerve and muscle, and possibly macrophages.

Key words: denervation; nerve; regeneration; satellite cells; skeletal muscle

***Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Gordana Starčević-Klasan, dr. med.
Katedra za anatomiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: gordanask@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

GRADJA SKELETNOG MIŠIĆA

Skeletni mišić ima mišićni dio koji je izgrađen od poprečnoprugastog mišićnog tkiva i rahlog vezivnog tkiva, u kojem su uložene krvne žile, limfne žile i živčana vlakna, te krajeve koje izgrađuju tetive. Mišićni dio izgrađen je od mišićnih vlakana koja čine njegovo funkcionalno tkivo i od vezivnog tkiva koje organizira mišićna vlakna u strukturu mišića dajući mu oblik i osiguravajući svakom mišićnom vlaknu dovod krvnih i limfnih žila te živčanih vlakana. Vezivo koje okružuje pojedinačna vlakna naziva se endomizij, perimizij obavlja manje i veće snopove mišićnih vlakana dok epimizij predstavlja vanjsku vezivnu ovojnica mišića. Skupinu mišića izvana prekriva fascija. Stanice poprečnoprugastog mišićnog tkiva su mišićne stanice koje imaju izrazito izduženi cilindrični oblik, pa su zbog toga dobile naziv mišićna vlakna. Mišićno vlakno je multinuklearna stanica s velikim brojem periferno smještenih jezgara čiji broj varira s obzirom na dužinu vlakna. Sva mišićna vlakna skeletnog mišića su paralelna i pružaju se od tetive do tetive, što znači da se vlakno uvijek povezuje s tkivom tetive. Na poprečnom presjeku vlakna imaju kružan ili poligonalan oblik s promjerom od 10 do 100 μm . Mišićno vlakno obavlja stanična membrana koja se naziva sarkolema. Ima dva sloja, unutrašnji je plazmalema, a vanjski je bazalna lamina koja ostvaruje vezu mišićnog vlakna s endomizijem. Između ta dva sloja nalaze se satelitske stanice koje imaju značajnu ulogu u regeneraciji mišića. Gledajući poprečnoprugasto mišićno tkivo pod svjetlosnim mikroskopom uočava se poprečna ispruganost, po čemu je ono i dobilo svoje ime. Poprečna ispruganost je rezultat njegove pravilno organizirane ultrastrukture. Cijelom dužinom mišićnog vlakna, uložena u njegovu citoplazmu ili sarkoplazmu, pružaju se mišićna vlaknca – miofibrile, koje su građene od pravilno posloženih miofilamenta – aktinskih i miozinskih niti. Miofibrile su nosioci kontraktilne sposobnosti mišića. Aktinska nit sastoji se od tri različite bjelančevine, aktina, tropomiozina i troponina. Miozinsku nit izgrađuje protein miozin koji ukupno čini 25 % svih proteina u skeletnim mišićnim stanicama. Sastavljen je od dva teška (engl. *myosin heavy chains*; MHCs) i četiri laka lanca (engl. *myosin light chains*; MLCs). Miozinska nit ima gla-

vu i rep. Rep čine dva teška lanca, dok glavu čine oba teška lanca i četiri laka lanca. Glavom se miozinska nit povezuje s aktinskom niti uz djelovanje adenozin-trifosfata i kalcija¹.

Još u 17. stoljeću znanstvenici su došli do spoznaja da je boja određenih mišića povezana s njihovom funkcijom, a tek početkom dvadesetog stoljeća se intenzivnijim istraživanjima dobio uvid u strukturalne i enzimske karakteristike različitih mišića². Danas je poznato da je skeletni mišić mozaik različitih tipova mišićnih vlakana u različitom

Mišićne satelitske stanice nekada su se smatrale jedinim izvorom miozenih stanica u procesu oporavka mišića. Novija istraživanja pokazuju da postoje mnoge multipotentne stanice u različitim tkivima kao što su koštana srž, neuralno tkivo ili mezenhimalno tkivo, koje se mogu diferencirati u mišićne stanice.

postotku. Podjelu i određivanje tipova mišićnih vlakana može se izvršiti na temelju njihovih različitih karakteristika. To može biti određivanjem njihove metaboličke aktivnosti, brzine kontrakcije mišićnih vlakana ili izoforme teških lanaca miozina (engl. *Myosin Heavy Chain*; MHC)³. Mišići sisavca sadrže četiri glavne izoforme teških lanaca miozina: MHC I, MHC IIA, MHC IIB i MHC IIX, što skeletni mišić čini izrazito heterogenim tkivom. Jednostavnije se označavaju kao mišićna vlakna tip I, IIA, IIB i IIX. Proučavajući brzinu kontrakcije vlakna tipa IIA, IIX i IIB su brzokontraheirajuća vlakna, dok su vlakna tipa I sporokontraheirajuća vlakna³. Sukladno tome, skeletni mišići koji sadrže pretežito vlakna tipa I i nešto vlakana tipa IIA nazivaju se spori mišići. Primjeri sporih mišića su mišići poput soleusa i vastusa intermediusa. Suprotno tome skeletni mišići koji sadrže pretežito vlakna tipa IIB i IIX nazivaju se brzi mišići. Primjeri su gastrokemijus, plantaris i ekstenzor digitorum longus⁴. Osim u građi, postoje i razlike u metabolizmu mišićnih vlakana. Brza vlakna osiguravaju energiju anaerobnom glikolizom s većom aktivnošću miozinske adenozin-trifosfataze (mATPaze). Za razliku od njih spora mišićna vlakna imaju aerobni metabolizam, velik oksidativni kapacitet i pokazuju manju aktivnost mATPaze^{5,6}. Dakle, osim razlika u molekularnim svojstvima, između

pojedinih mišićnih vlakana postoji i funkcionalna i metabolička razlika, što dodatno pridonosi heterogenosti skeletnog mišića.

Postotak zastupljenosti pojedinih vrsta MHC molekula u zreloom mišićnom vlaknu mijenja se, tj. mišićna vlakna posjeduju sposobnost prilagodbe na različite fiziološke i patološke uvjete. Ta prilagodba očituje se kroz promjenu pokazivanja mišićnih gena, što dovodi do promjene tipova mišićnih vlakana i mišićnog fenotipa. Promjenu fenotipa može uzrokovati električna stimulacija⁷, hormonalni utjecaji⁸, promjene u opterećenju mišića^{9,10} te denervacija mišića³. Elektrostimulacijom niskofrekventnim strujama dolazi do promjena u mišićnom fenotipu na način da mišićna vlakna poprimaju karakteristike sporokontrahirajućih mišićnih vlakana. Nasuprot tome, primjenom struja visokih frekvencija mišić mijenja fenotip u brzokontrahirajućih⁷. Istraživanja su pokazala kako u slučajevima smanjene količine hormona štitnjače¹³ ili povećanog mehaničkog opterećenja^{9,10} u sporokontrahirajućim mišićima dolazi do prijelaza vlakana tipa IIA i IIX u tip I, dok u brzokontrahirajućim mišićima isti podražaji dovode do transformacije vlakana tipa IIB i IIX u vlakna tipa IIA ili tip I. Opisani primjeri prilagodbe mišićnih vlakana na novonastale uvjete potvrđuju plastičnost mišićnog tkiva, koje promjenom fenotipa odgovara podražajima iz okoline.

INERVACIJA SKELETNOG MIŠIĆA

Akson ili živčano vlakno motorne živčane stanice, smještene u sivoj tvari središnjeg živčanog sustava, razgranjuje se unutar mišića i svaki ogranak inervira jedno mišićno vlakno. Spoj živčanog vlakna s mišićnim vlaknom naziva se motorna ploča koja je smještena otprilike na sredini mišićnog vlakna. Živčano vlakno prije nego pristupi mišićnom vlaknu gubi mijelinsku ovojnica i proširuje se čineći presinaptički dio neuromuskularne sinapse. Živčani impuls potiče oslobađanje neurotransmitera acetilkolina u sinaptičku pukotinu koji podražuje receptore na postsinaptičkoj mišićnoj membrani, što dovodi do stvaranja akcijskog potencijala i kontrakcije mišićnih vlakana. Sva mišićna vlakna koje inervira jedan akson preko svojih ogranaka, odnosno jedna živčana stanica, čine jednu funkcionalnu formaciju koja se naziva motorna jedinica. Vlakna jedne motorne jedinice su

sva istog tipa. Veličine motornih jedinica razlikuju se od mišića do mišića ovisno o funkciji koju ti mišići obavljaju. U mišićima koji obavljaju precizne, fine funkcije, jedna živčana stanica inervira nekoliko mišićnih vlakana. Primjer su mišići oka ili mišići prstiju. U mišićima ekstremiteta koji su odgovorni za kretanje i posturu jedna živčana stanica inervira i do 2000 mišićnih vlakana. Vlakna jedne motorne jedinice nisu grupirana već se vlakna susjednih motornih jedinica isprepliću, što znači da je vlakno jedne motorne jedinice okruženo vlaknima neke druge motorne jedinice. Između mišićnih vlakana, otprilike na sredini mišićnog trbuha, smješten je mišićni proprioceptor, mišićno vreteno. Stoga živac koji ulazi u mišić sadrži i motorna i osjetna živčana vlakna. Najveći broj motornih vlakana su debela alfa-motorna vlakna koja inerviraju skeletna mišićna vlakna, dok je manji broj tankih gama-motornih vlakana koja inerviraju intrafuzalna mišićna vlakna u mišićnom vretenu. Osjetna vlakna odvođe podražaj iz mišićnih i tetivnih vretena o napetosti mišića i tetiva do sive tvari središnjeg živčanog sustava¹.

DENERVACIJA SKELETNOG MIŠIĆA

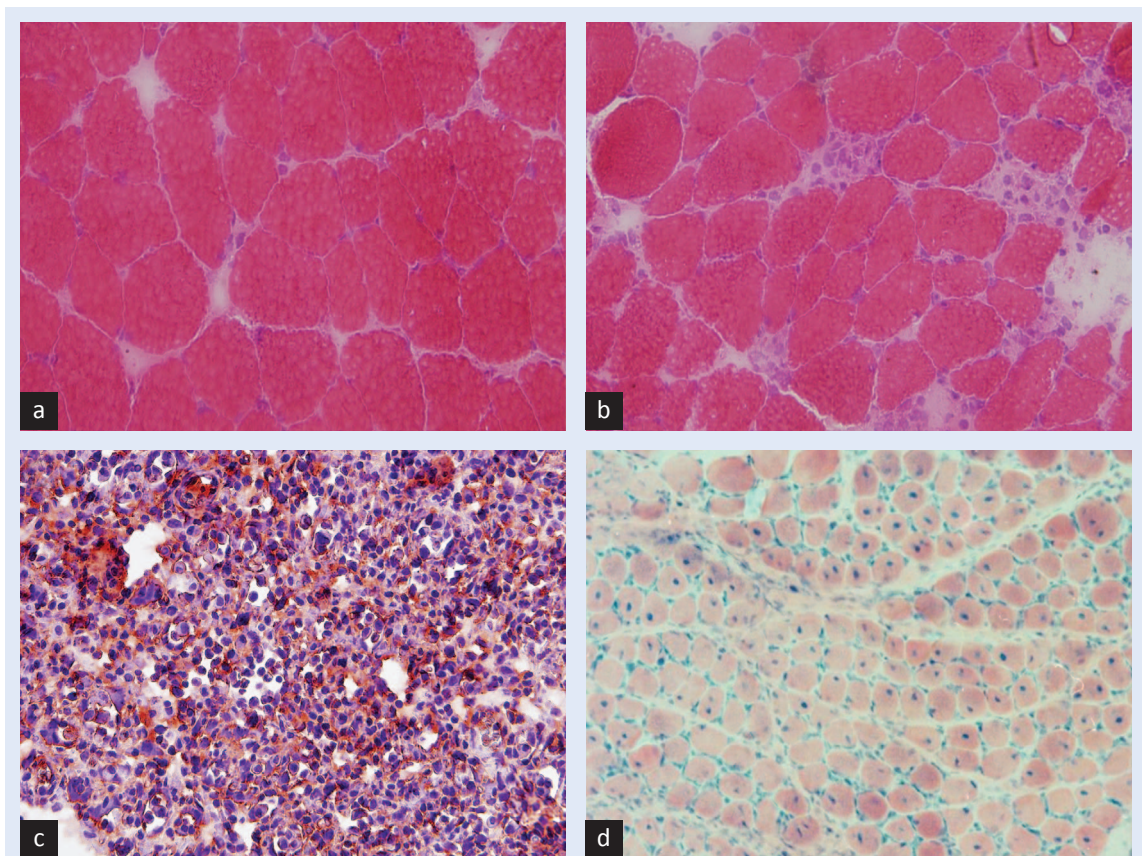
Ozljede perifernog živca mogu dovesti do atrofije skeletnog mišića i oštećenja njegove funkcije. Eksperimentalni model koji se najčešće koristi za proučavanje utjecaja živca na mišić je denervacija mišića presijecanjem perifernog živca koji taj mišić inervira¹². Denervacija mišića je proces karakteriziran atrofijom nakon koje slijedi proces regeneracije mišića. Atrofija mišića očituje se u ubrzanom gubitku mišićne mase i smanjenju poprečnog presjeka mišićnih vlakana. Denervacija uzrokuje promjene i u fenotipu mišića. Prvih mjeseci nakon što je nastupila denervacija različiti tipovi mišićnih vlakana reagiraju različito na denervaciju. Istraživanja su pokazala da su u brzim mišićima, kao što je štakorski dugački ekstenzor prstiju, brzokontrahirajuća vlakna odmah zahvaćena procesom atrofije, dok sporokontrahirajuća mišićna vlakna pokazuju male promjene u prvih nekoliko mjeseci, a onda i ova vlakna zahvati nagli proces atrofije. Tu činjenicu najbolje potvrđuje podatak da je dva mjeseca nakon denervacije stupanj atrofije brzih mišićnih vlakana tri do pet puta veći nego kod sporih mišićnih vlakana u različitim mišićima štakora¹². U brzim mi-

šćnim vlaknima dolazi do poremećaja enzimske aktivnosti, kao što je aktivnost kalcijске ATP-aze i nekih drugih enzima zbog gubitka živčane inervacije za razliku od sporih mišićnih vlakana u kojima te promjene nisu dokazane^{12,13}. Istraživanja pokazuju da nakon denervacije dolazi i do promjene distribucije tipa mišićnih vlakana u brzim i sporim mišićima. Primijećeno je da brzi mišići počinju pokazivati miozine karakteristične za spore mišiće, dok spori mišići dobivaju fenotipske značajke brzih mišića¹⁴. Denervacija dovodi do aktivacije satelitskih stanica. Te stanice su mitotski inaktivne sve dok ih ozljeda mišića ne potakne da uđu u stanični ciklus. Njihovom proliferacijom i diferencijacijom nastaju nova mišićna vlakna. Odmah po denervaciji opaža se porast broja satelitskih stanica koji se udvostruči već nakon prvog tjedna¹⁵. Dva mjeseca nakon denervacije postotak satelitskih stanica naraste tri puta u odnosu na kontrolu. Osim povećanja broja satelitskih stanica dolazi i do povećanog pokazivanja miogenih regulacijskih čimbenika, što dovodi do aktivacije miogeneze, odnosno procesa regeneracije. Aktivirane satelitske stanice stvaraju nove miotube koje su smještene ispod bazalne lamine postojećeg mišićnog vlakna. Miotube stvaraju svoju novu bazalnu laminu i odvajaju se od mišićnog vlakna na kojem nastaju. Ovaj tip miogeneze događa se u prvih dva do četiri mjeseca od denervacije, a zatim, ako nije došlo do reinervacije, progresivno opada zbog smanjenja broja satelitskih stanica u denerviranom mišićnom vlaknu¹². Slijedom rečenog možemo zaključiti kako denervacija dovodi do ekspresije drugih, netipičnih izoformi miozina u pojedinom mišiću¹⁶. Dugotrajna denervacija u konačnici uzrokuje pad broja jezgara mišićnog vlakna i smanjenje broja satelitskih stanica, čime se smanjuje regenerativna sposobnost mišićnoga tkiva^{17,18}.

OZLJEDA SKELETNOG MIŠIĆA I MIŠIĆNA REGENERACIJA

Regenerativna sposobnost skeletnih mišića dolazi do izražaja i kod ozljeda mišića. Moderna, translacijska znanost koristi različite modele ozljede skeletnog mišića u brojnim istraživanjima regenerativnih procesa čiji je cilj nova saznanja primijeniti u kliničkoj praksi te postići učinkovitije liječenje pacijenata koji boluju od narušene funkcije mišićnog

sustava. Od najčešćih eksperimentalnih modela ozljede koristi se mehaničko oštećenje mišića, ubrizgavanje lokalnog anestetika ili otrova u mišić, izlaganje pretjeranoj hladnoći ili toplini¹⁹. Ubrizgavanje lokalnog anestetika (bupivakain) najjednostavniji je i najkorišteniji eksperimentalni model koji dovodi do nekroze mišićnog tkiva i posljedične regeneracije²⁰. Početni događaj zbog ozljede mišića je nekroza oštećenih mišićnih vlakana koja je potaknuta oštećenjem stanične membrane mišićnih vlakana (sarkoleme). Rana faza ozljede mišića je karakterizirana upalnim odgovorom. Prve stanice koje dolaze na mjesto oštećenja su neutrofilni, dok 48 sati od ozljede makrofazi postaju najbrojnije stanice (slika 1). Najvažnija funkcija makrofaga je fagocitoza raspadnutih dijelova mišićnih stanica, no brojna novija istraživanja pokazala su da makrofazi luče faktore koji potiču proliferaciju mišićnih prekursornih stanica, njihov rast i diferencijaciju, te s obzirom na te okolnosti imaju vrlo važnu ulogu u procesu mišićne regeneracije^{19,21,22}. Nakon upalne faze slijedi faza regeneracije mišićnih vlakana. Faza regeneracije predstavlja vrlo kompleksan fenomen koji uključuje brojne regulatorne mehanizme i procese u centru kojih se nalaze tzv. satelitske stanice. Drugi dan nakon ozljede mišića započinje ubrzana proliferacija mišićnih satelitskih stanica koje u toj fazi nazivamo mioblasti^{20,23}. Nakon nekoliko ciklusa dijeljenja mioblasti se diferenciraju u miocite koji se spajaju međusobno tvoreći nova mišićna vlakna (miotube) koja nadomještaju ozlijeđena mišićna vlakna. Mali dio satelitskih stanica ne ulazi u proces diferencijacije nego se vraća u mitotički mirno stanje, što predstavlja mehanizam samo-obnavljanja rezervoara mišićnih satelitskih stanica²⁰. Najvažniji faktor uspješne regeneracije ozlijeđenog mišića je održana bazalna lamina mišićnih vlakana nakon što makrofazi očiste nekrotično tkivo. Time su očuvane i satelitske stanice koje se nalaze ispod bazalne lamine. Također, različiti faktori kao što su vrsta mišićne ozljede, dobra krvna opskrba i ponovno uspostavljanje poremećenih neuro-mišićnih i mišićno-tetivnih veza mogu utjecati na oporavak regenerirajućeg mišića. Na poprečnim histološkim rezovima novoformirana mišićna vlakna su manjeg poprečnog promjera, a karakteriziraju ih centralno smještene jezgre i često se boje bazofilnim bojama, što upućuje na po-



Slika 1. Promjene u mišiću soleusu štakora nakon ozljede injekcijom lokalnog anestetika bupivakaina prikazano hemalaun eozin bojenjem. Injekcija bupivakainom u prvim satima uzrokuje infiltraciju mišića upalnim stanicama (b) te masivnu degeneraciju mišićnih vlakana tri dana nakon ozljede (c). Oporavak mišića opaža se 14 dana nakon injekcije (d) s mnoštvom bazofilno obojenih regenerirajućih vlakana s centralno smještenim jezgrama. Prikaz normalnog mišića (a).

jačanu sintezu proteina^{20,24} (slika 1). Osim toga, pokazuju embrionalnu formu teških lanaca miozina, što upućuje na nov nastanak mišićnih vlakana. Jednom kada se miotube spoje, novoformirana mišićna vlakna rastu, a jezgre se pomiču na periferiju. U normalnim uvjetima, kada završi proces regeneracije, regenerirani mišić morfološki i funkcionalno u potpunosti je sličan zdravom neozlijeđenom mišiću²⁰.

REGENERACIJSKI (REG) GENI

Unatoč značajnom napretku u razumijevanju genetike mišića, patofizioloških procesa mišićnih bolesti, molekularnih i staničnih čimbenika uključenih u proces regeneracije mišića, još uvijek su u tijeku intenzivna istraživanja s ciljem otkrića učinkovitog tretmana mišićnih bolesti koje karakterizira propadanje mišića. U istraživanjima regeneracijskih procesa u različitim organima sve veća pažnja

usmjerena je na grupu regeneracijskih (Reg) gena za koje se pokazalo da imaju vrlo važnu ulogu u procesima regeneracije različitih tkiva, kao što je tkivo gušterače, želuca, crijeva, srčanog mišića u čijim se stanicama stvaraju. Proteini Reg genske obitelji pripadaju superobitelji životinjskih lektina ovisnih o kalciju. Oni predstavljaju skupinu malih proteina koji djeluju kao reaktanti akutne faze, sudjeluju u procesima stanične adhezije, djeluju kao antiapoptotični faktori i faktori rasta mnogih stanica kao što su β -stanice gušterače, živčane stanice i stanice sluznice gastrointestinalnog sustava²⁵. U posljednjih dvadeset godina izolirano je sedamnaest regeneracijskih gena iz tkiva čovjeka, miša i štakora, koji su grupirani u tri podrazreda, Reg I, Reg II, Reg III i Reg IV, a svaki podrazred podijeljen je u nekoliko podtipova Reg gena koji se označavaju arapskim brojkama (tablica 1)²⁶. Osim uloge u regeneracijskim procesima nakon ozljede tkiva, Reg

geni sudjeluju i u procesima upale i nastanka različitih tumora. Navedeni procesi mogu potaknuti ekspresiju Reg gena u tkivima u kojima se inače ne pokazuju ili uzrokovati jaču ekspresiju (*upregulation*) u tkivima u kojima su inače prisutni²⁶. Postoje vrlo interesantna istraživanja o regulaciji Reg genskog pokazivanja tijekom razvojnih procesa nekih organa. Istraživanja na tkivu gušterače mišjih embrija pokazala su da se Reg I i Reg II geni pokazuju u stanicama Langerhansovih otočića gušterače što upućuje na njihovu vrlo važnu ulogu u razvojnim procesima tih stanica. Nakon okota njihovo pokazivanje prestaje i javlja se opet za vrijeme života zbog različitih patoloških stanja kao što su šećerna bolest, upala ili razvoj tumora²⁷. Sličan obrazac pokazivanja Reg III gena opažen je i tijekom razvoja kralježnične moždine u embriju miša. Reg III gen se javlja u 14. danu embrionalnog razvoja miša i prisutan je u motoneuronima prednjeg roga ali i u osjetnim živčanim stanicama koje izgrađuju spinalne ganglije i važan je za rast neurona. Njegovo pokazivanje nakon razvojnih promjena prestaje te se ponovno javlja kod odraslih životinja nakon ozljede perifernog živca. Osim pojačanog pokazivanja u regenerirajućim motoneuronima prednjeg roga kralježnične moždine, prisutan je i u ozlijeđenim Schwannovim stanicama perifernog živca te uzrokuje njihovu proliferaciju^{28,29}.

Od njihovog otkrića posebna pažnja istraživača bila je usmjerena na utjecaj Reg gena na rast i proliferaciju β -stanica gušterače, što može dovesti do poboljšanja eksperimentalno izazvane šećerne bolesti kod životinje. Primjena Reg proteina koji izazi-

va ekspanziju β -stanica zajedno s lijekovima koji smanjuju autoimuni odgovor predstavlja obećavajući terapijski pristup liječenja inzulinske bolesti^{27,30}. Reg proteini imaju važnu ulogu i u procesima cijeljenja lezija sluznice gastrointestinalnog sustava. Tijekom upalnih procesa na tim sluznicama dolazi do povećanog pokazivanja Reg gena, što dovodi do povećanog rasta i proliferacije stanica sluznice i njenog cijeljenja^{31,32}. No neka istraživanja su pokazala da pojačano i dugotrajno pokazivanje Reg gena u stanicama sluznica i pove-

Zbog proliferativnog i antiapoptičnog djelovanja Reg proteini predstavljaju skupinu proteina s velikim potencijalom za upotrebu kao markera u dijagnostici različitih tumora i kao lijekova u terapiji šećerne bolesti.

ćana koncentracija upalnih citokina predstavlja visok rizik za razvoj karcinoma. Pokazivanje Reg gena u stanicama karcinoma želuca ili kolona značajno korelira s invazivnošću tih karcinoma i njihovom lošom prognozom zbog inhibicije apoptotične stanične smrti i pojačanog rasta i proliferacije tumorskih stanica^{33,34}.

ULOGA REGENERACIJSKIH GENA U SKELETNOM MIŠIĆU I PERIFERNOM ŽIVCU

Interesantan je podatak da zdravi skeletni mišić ne pokazuje niti jedan tip gena Reg genske obitelji^{35,36}, no dokazano je pokazivanje Reg gena u ozlijeđenom perifernom živcu³⁷. Ovi rezultati otvaraju pitanje na koji način ozljeda mišića djeluje na pokazi-

Tablica 1. Podjela članova Reg genske obitelji kod štakora, čovjeka i miša.

Podskupina	Štakor	Čovjek	Miš
I	Reg1	Reg1 α	Reg1
		Reg1 β	
II			Reg2
III	PAP1 (Reg2, Peptid 23)	HIP/PAP	Reg3 α
	Reg3A (PAP2, PAP2A, PAP2B)	INGAP-rp	Reg3 β
	Reg3G (PAP3)		Reg3 γ
			Reg3 δ
IV	Reg4	Reg4	Reg4

Reg – regenerating protein; PAP – pancreatitis-associated protein; HIP/PAP – hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein; INGAP-rp – islet neogenesis-associated protein-related protein

vanje Reg gena, te uzrokuje li ozljeda perifernog živca promjene u pokazivanju spomenutih gena. Pokazivanje Reg gena proučavano je kroz različite modele ozljede mišića. Jedan od modela je ubrizgavanje lokalnog anestetika u mišić soleus i ekstenzor digitorum longus štakora koji uzrokuje uništavanje tkivne arhitekture, migracije i infiltracije neutrofila i makrofaga, lučenje upalnih medijatora s posljedičnom nekrozom tkiva. Svi ti procesi dovode do pojačanog pokazivanja Reg3G (podrazred Reg III) gena u navedenim mišićima. Trećeg dana od izazivanja procesa regeneracije dolazi do najjačeg pokazivanja Reg3G gena, što se može pratiti sve do sedmog dana, kada njegovo pokazivanje prestaje. Drugi model ozljede mišića je denervacija mišića soleusa i ekstenzor digitorum longusa štakora presijecanjem ishijadičnog živca koji te mišiće inervira. Ta ozljeda dovodi do naglih i značajnih promjena u skeletnim mišićima. Dolazi do proliferacije satelitskih stanica te se unutar tjedan dana od denervacije njihov broj udvostruči. Denervacijski model također uzrokuje pokazivanja Reg 3G gena 24 sata nakon izazvane denervacije, vrijednosti pokazivanja rastu do trećeg dana te se nakon sedmog dana više ne može detektirati. Model regeneracije skeletnog mišića koji uključuje ubrizgavanje lokalnog anestetika u mišić i istovremeno presijecanje ishijadičnog živca dovodi do velikih promjena u mišiću. Pretpostavka je da će promjene u pokazivanju Reg gena biti drukčije nego u ostala dva modela zbog sinergističkog utjecaja dviju ozljeda na mišić. U kombiniranom modelu regeneracije Reg3G pojavljuje se već 12 sati nakon ozljede i nestaje nakon sedmog dana kao i u ostalim modelima ozljede mišića³⁶.

Mišić i živac koji ga inervira predstavljaju funkcionalnu cjelinu, a njihova uzajamna povezanost potvrđena je mnogobrojnim istraživanjima. Proces koji se događaju u živcu djelovat će na mišić koji taj živac inervira i obrnuto. Stoga je istraživanje Reg gena proučavano na ishijadičnom živcu koji inervira mišić soleus i ekstenzor digitorum longus. U modelu regeneracije mišića s ubrizgivanjem lokalnog anestetika ishijadični živac ostao je intaktan tijekom izvođenja postupka. Ekspresija Reg3G gena zabilježena je u živcu trećeg dana od ozljede mišića i ostaje prisutna do sedmog dana. Presijecanje ishijadičnog živca kod štakora često je korišten eksperimentalni model ozljede perifernog živca koji se

koristi za proučavanje procesa regeneracije perifernog živčanog tkiva. U pokusima presijecanja živca proučavao se učinak ozljede na proksimalni i distalni okrajak ozlijeđenog živca. Naime, poznato je da dolazi do aktivacije Schwannovih stanica, koje proizvode proupalne citokine i neurotrofične faktore koji su važni za uspješnu regeneraciju perifernog živca. Na molekularnoj razini, između Schwannovih stanica i ozlijeđenog živca odvija se značajna komunikacija citokinima i faktorima rasta. Jedna od molekula koju otpuštaju ozlijeđeni neuroni prema Schwannovim stanicama je i Reg2 protein. Istraživanjem je pokazano da nema pokazivanja Reg3G gena ni u proksimalnom ni u distalnom dijelu ishijadičnog živca, što upućuje na zaključak da to nije faktor koji ima ključnu ulogu u regeneraciji ishijadičnog živca. No u kombiniranom modelu ozljede mišića i presijecanja ishijadičnog živca došlo je do ekspresije Reg3G gena u proksimalnom i distalnom dijelu živca. Reg3G gen pojavljuje se 12 sati od ozljede i njegovo pokazivanje nestaje nakon sedam dana od ozljede³⁶.

Sama ozljeda mišića lokalnim anestetikom dovoljna je da trećeg dana izazove pokazivanje Reg3G gena u ishijadičnom živcu koji inervira ozlijeđeni mišić. Model denervacije nije uspješan u izazivanju ekspresije Reg3G gena niti u proksimalnom, a niti u distalnom dijelu živca, no ipak se ekspresija Reg3G gena bilježi u oba dijela živca kombiniranog modela ozljede³⁶. Kako je moguće da kombinirani model izaziva ekspresiju Reg3G gena u proksimalnom dijelu živca koji je fizički odvojen od svog, lokalnim anestetikom ozlijeđenog mišića, potrebno je razjasniti dodatnim istraživanjima. Također bi daljnjim istraživanjima trebalo obuhvatiti i druge podtipove Reg gena i dokazati njihov obrazac pokazivanja u skeletnom mišiću i živcu tijekom različitih modela ozljede. Opisana istraživanja potvrđuju kako se pokazivanje Reg gena javlja u ranim fazama ozljede, što upućuje na njegovu ulogu reaktanta akutne faze upale i faktora rasta koji uzrokuje proliferaciju i rast satelitskih stanica u skeletnom mišiću, odnosno proliferaciju i rast Schwannovih stanica u perifernom živcu. Isto tako, važna je njihova uloga kao posrednika u signaliranju između ozlijeđenog živca i mišića te upalnih makrofaga.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Bobinac D, Dujmovic M. Osnove anatomije. Rijeka: Glosa Rijeka, 2003;67-86.
2. Brown DE, Sichel FJ. The myogram of the isolated skeletal muscle cell. *Science* 1930;72:17-8.
3. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996;76:371-423.
4. Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 1984;171:259-72.
5. Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1955;3:170-95.
6. Staron RS, Hikida RS. Histochemical, biochemical, and ultrastructural analyses of single human muscle fibers, with special reference to the C-fiber population. *J Histochem Cytochem* 1992;40:563-8.
7. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol (Lond)* 1960;150:417-39.
8. Mahdavi V, Izumo S, Nadal-Ginard B. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ Res* 1987;60:804-14.
9. Fitts RH, Widrick JJ. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev* 1996;24:427-73.
10. Caozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1996;24:321-61.
11. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 1993;118:1137-47.
12. Borisov AB1, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 2001;264:203-18.
13. Loirat MJ, Lucas-Heron B, Ollivier B, Leoty C. Calcium binding protein changes of sarcoplasmic reticulum from rat denervated skeletal muscle. *Biosci Rep* 1988;8:369-78.
14. Webster C, Blau HM. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 1990;16:557-65.
15. Rahimov F, Kunkel LM. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol* 2013;201:499-510.
16. Schiaffino S, Gorza L, Parry D. Age-related failure of muscle regeneration in the dystrophic dy2J/dy2J mouse. *Rendiconti Lincei Sci Fis Nat* 1993;4:269-77.
17. Wallace GQ1, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 2009;71:37-57.
18. Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci* 1984;64:149-60.
19. Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des* 2010;16:906-14.
20. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-38.
21. Tidball JG. Inflammation in skeletal muscle regeneration. *In: Schiaffino S, Partridge T (eds). Skeletal muscle repair and regeneration.* Dordrecht: Springer, 2008;243-68.
22. Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neuro Sci* 2002;23:189-94.
23. Zammit PS. The muscle satellite cell: the story of a cell on the edge! *In: Schiaffino S, Partridge T (eds). Skeletal muscle repair and regeneration.* Dordrecht: Springer, 2008;45-64.
24. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 1990;141:24-40.
25. Zhang YW1, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:2635-41.
26. Parikh A, Stephan AF, Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling. *Biomol Concepts* 2012;3:57-70.
27. Perfetti R, Raygada M, Wang Y, Zenilman ME, Egan JM, Denno KM et al. Regenerating (reg) and insulin genes are expressed in prepancreatic mouse embryos. *J Mol Endocrinol* 1996;17:79-88.
28. Lasserre C, Colnot C, Bréchet C, Poirier F. HIP/PAP gene, encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer, is expressed in nervous system as well as in intestine and pancreas of the postimplantation mouse embryo. *Am J Pathol* 1999;154:1601-10.
29. Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M et al. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol* 2000;2:906-14.
30. Okamoto H. The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999;6:254-62.
31. Kinoshita Y, Ishihara S, Kadowaki Y, Fukui H, Chiba T. Reg protein is a unique growth factor of gastric mucosal cells. *J Gastroenterol* 2004;39:507-13.
32. Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R et al. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg alpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *J Investig Med* 2002;50:421-34.
33. Rechreche H, Montalto G, Mallo GV, Vasseur S, Marasa L, Soubeyran P et al. Pap, reg lalpha and reg lbeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1999;81:688-94.
34. Zenilman ME, Kim S, Levine BA, Lee C, Steinberg JJ. Ectopic expression of reg protein: A marker of colorectal mucosa at risk for neoplasia. *J Gastrointest Surg* 1997;1:194-202.
35. Azman J, Starcevic-Klasan G, Ivanac D, Picard A, Jurisic-Erzen D, Nikolic M et al. Reg IV protein and mRNA expression in different rat organs. *Acta Histochem* 2011;113:793-7.
36. Klasan GS, Ivanac D, Erzen DJ, Picard A, Takasawa S, Peharec S et al. Reg3G gene expression in regenerating skeletal muscle and corresponding nerve. *Muscle Nerve* 2014;49:61-8.
37. Namikawa K, Fukushima M, Murakami K, Suzuki A, Takasawa S, Okamoto H et al. Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:126-34.