

Mišićne progenitorne stanice u skeletnom mišiću

Muscle progenitor cells in skeletal muscle

Snježana Bajek^{1*}, Marina Nikolić¹, Tamara Šoić Vranić¹, Marin Bajek², Ivana Marić¹

Sažetak. Iako su malobrojne, satelitske stanice u skeletnom mišiću mogu u slučaju ozljede proizvesti velik broj mioblasta koji će daljnjim procesom regenerativne miogeneze dovesti do obnove mišićnog tkiva. Ove stanice su matične stanice specifične za mišićno tkivo. Njihovom aktivacijom pokreće se slijed u ekspresiji miogenetskih regulacijskih čimbenika i time program miogeneze. Satelitskim je stanicama svojstvena sposobnost samoobnavljanja. One predstavljaju heterogenu skupinu stanica s obzirom na funkciju i na markere kojima se dokazuju. Pored satelitskih stanica izolirane su i druge matične stanice u mišiću koje u eksperimentalnim uvjetima pridonose miogenezi. Miogenetski potencijal ovih stanica pokušava se iskoristiti u terapijske svrhe u nekim oblicima mišićnih oboljenja.

Ključne riječi: regeneracija; satelitske stanice; skeletni mišić

Abstract. Although not numerous, satellite cells in skeletal muscle are capable to generate a large number of myoblasts upon injury. A further process of regenerative myogenesis leads to the muscle regeneration. Satellite cells are stem cells specific to skeletal muscle tissue. Their activation initiates the sequence of expression in myogenic regulatory factors and thus myogenic program. Besides the ability to provide new myoblasts, these cells also have self-renewing capacity. Satellite cells are a heterogeneous group of cells considering their function and distinction markers. Several other types of stem cells with myogenic ability (in experimental conditions) have been isolated from the skeletal muscle. Therapeutic approaches to treat some forms of muscular diseases have been based on myogenic potential of both groups of stem cells.

Key words: regeneration; satellite cells; skeletal muscle

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

²Zavod za mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

*Dopisni autor:

Prof. dr. sc. Snježana Bajek, dr. med.
Zavod za anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: snjezana.bajek@medri.uniri.hr

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

SATELITSKE STANICE I MIOGENI REGULACIJSKI ČIMBENICI

Mišićno tkivo sposobno je regenerirati se, iako se sastoji od visoko diferenciranih mišićnih vlakana s periferno smještenim postmitotskim jezgrama. Dakle, jezgre postojećih mišićnih stanica nemaju mogućnost diobe kojom bi se dobili novi mionukleusi, a potom i novi segmenti mišićnog vlakna. Upravo tu sposobnost stvaranja novog mišićnog tkiva nakon ozljede, tj. sposobnost mišićne rege-

Mnogi ekstrinzični signali iz neposredne okoline satelitske stanice, tj. njezine niše, kao i intrinzični regulatori, određuju hoće li stanica ostati u mirnom stanju, krenuti u samoobnavljanje ili u stvaranje mioblata.

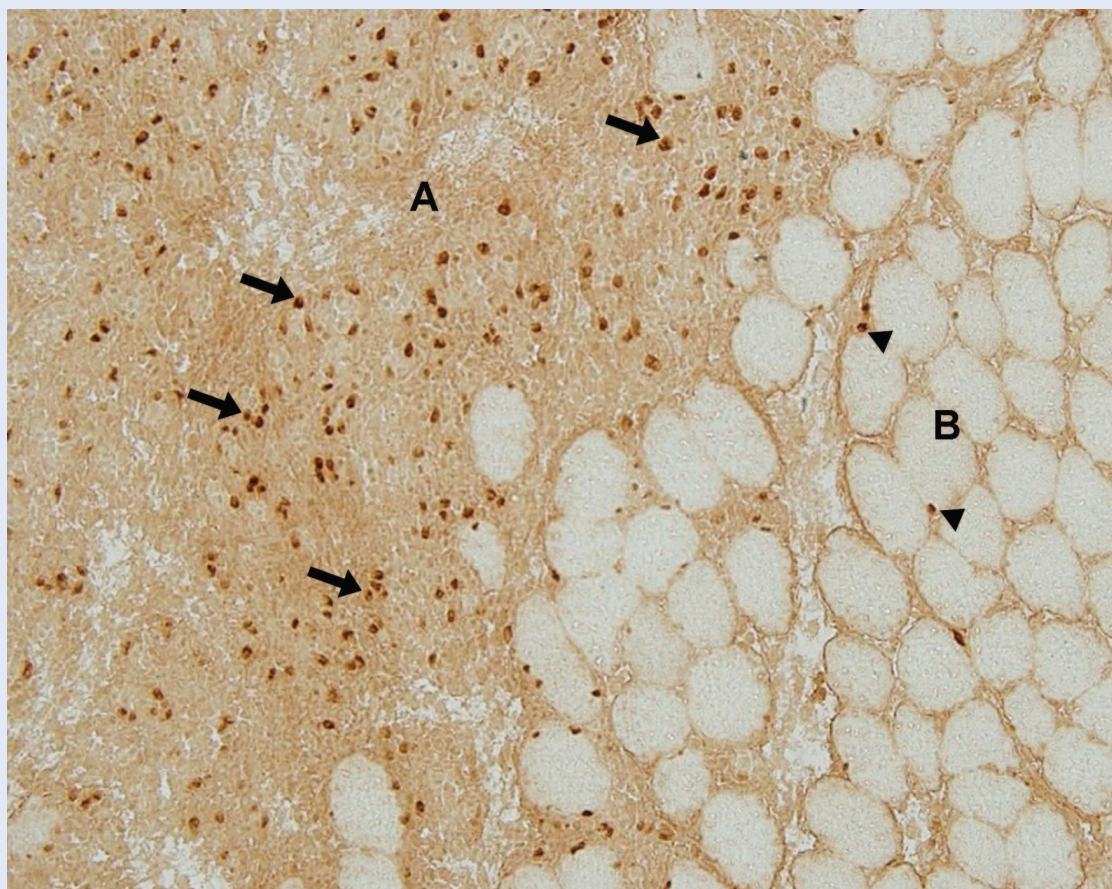
neracije, imaju stanice koje su smještene između sarkoleme i bazalne membrane mišićnog vlakna, a zbog takvog perifernog položaja nazvane su satelitskim stanicama¹. Osim u regeneraciji, one sudjeluju u rastu skeletnog mišićnog tkiva, u njegovom remodeliranju i održavanju. Osim što stvaraju nove mišićne stanice, tj. mioblaste, ove stanice imaju i sposobnost samoobnavljanja te na taj način održavanja i svoje vlastite populacije. Za vrijeme rasta one se dijele asimetričnom diobom stvarajući jednu stanicu koja će se fuzionirati s mišićnim vlaknom i drugu koja će proliferirati ili će postati mirna². Iako je njihova sposobnost samoobnavljanja ograničena, satelitske stanice mogu se smatrati matičnim (engl. *stem*) stanicama u odraslih osoba. Satelitska stanica je mitotski mirna stanica, a može biti aktivirana traumom, bolešću ili nekim promijenjenim stanjem. Nakon aktivacije dolazi do proliferacije kojom nastaju mononuklearne mišićne prekursorne stanice ili mioblata. Prestankom proliferacije nastupa diferencijacija mioblata i njihovo međusobno spajanje, kako bi nastalo novo mišićno vlakno koje postepeno postaje zrelo sadržavajući opet periferne postmitotične jezgre. Mioblata se također mogu spojiti i s već postojećim oštećenim mišićnim vlaknom³.

Gotovo sve mirne satelitske stanice eksprimiraju homeobox transkripcijski faktor Pax7⁴ (engl. *paired box 7*) koji se stoga koristi i kao njihov marker. Nakon aktivacije satelitskih stanica pokreće se pro-

gram miogeneze izražajem miogenetskih transkripcijskih čimbenika, odnosno miogenetskih regulacijskih čimbenika koji se pojavljuju također i tijekom embrionalne i fetalne, odnosno razvojne miogeneze.

Miogenetski regulacijski čimbenici ključni su u determinaciji i diferencijaciji skeletnog mišića. To su proteini koji se moraju heterodimerizirati s nekim od članova rasprostranjene obitelji E proteina i kao kompleks vezati se na određenu sekvenciju DNA-a nazvanu E box na pojačivačima i promotorima mišićnih gena. Na taj način ovi čimbenici aktiviraju transkripciju gena koji su specifični za mišiće⁵. Ovoj grupi čimbenika pripadaju myf5 (engl. *myogenic factor 5*), myoD (engl. *myogenic differentiation*), miogenin i MRF4 (engl. *myogenic regulatory factor 4*). Najprije je izoliran transkripcijski čimbenik myoD koji je u kulturi fibroblasta doveo do njihove preobrazbe u mišićne stanice⁶. Otkriveni su u kasnim osamdesetima, a izučavani su u brojnim studijama *in vivo* tijekom embrionalnog razvoja i mišićne regeneracije, na miševima s nul-mutacijama na genima za miogenetske regulacijske čimbenike, te u pokusima *in vitro*.

Studije na genetski modificiranim miševima i na mišićnim staničnim linijama pokazale su da su transkripcijski čimbenici myf5 i myoD determinacijski čimbenici koji određuju razvoj stanica u pravcu mišićne stanice⁷. Uloga preostalih dvaju regulacijskih čimbenika, miogenina i MRF4, jest u procesu diferencijacije mioblata i aktiviranju gena za formiranje miotubusa^{8,9}. No neki od ovih četiriju čimbenika mogu se donekle međusobno nadomjestiti⁷, te se vezati na istim mjestima na DNA¹⁰ i tako djelomično preklapati u ulogama. Pored uloge u završnoj diferencijaciji tijekom razvoja, MRF4 transkripcijski čimbenik također sudjeluje i u ranoj fazi razvojne miogeneze, tj. u determinaciji stanice u mišićnom smjeru^{11,12}. Način ekspresije ovih četiriju regulacijskih miogenetskih čimbenika u procesu razvojne miogeneze dosta nalikuje na njihovo izražavanje tijekom regeneracije mišića, odnosno regeneracijske miogeneze¹³. Naime, većina mirnih satelitskih stanica uz transkripcijski čimbenik Pax7 (u nekim mišićima i Pax3¹⁴) izražava i myf5 regulacijski čimbenik¹⁵. Aktivacijom satelitske stanice, primjerice tijekom ozljede mišića, stanica postaje myoD pozitivna, dijeli se stvarajući mišićne prekursorne stanice ili



Slika 1. Imunohistokemijski prikaz ekspresije miogenina na poprečnom presjeku štakorskog mišića masetera trećeg dana nakon ozljeđivanja bupivakainom. Vide se brojne miogenin pozitivne stanice (strjelice) u regenerirajućem dijelu mišića (A), ali i rijetke pozitivne stanice (vrh strjelice) između sačuvanih vlakana u blizini zone regeneracije (B). Originalno povećanje 200 ×.

mioblaste^{16,17} koji se uz povećanu ekspresiju miogenina i MRF4 fuzioniraju s oštećenim vlaknom¹⁸. Pojavom čimbenika diferencijacije, tj. miogenina (slika 1) i MRF4, smanjuje se ekspresija čimbenika myf5 i Pax7, dok myoD regulacijski čimbenik ostaje još aktivan u dijelu procesa diferencijacije¹⁹. Za razliku od razvojne miogeneze, transkripcijski čimbenik MRF4 ne pojavljuje se na početku procesa regeneracijske miogeneze. Uloga myf5 čimbenika tijekom regeneracije mišića je podržavanje proliferacije mioblasta²⁰ u čemu zajedno s njim sudjeluje i myoD čimbenik koji u koordinaciji s miogeninom ostvaruje diferencijaciju mioblasta. Pri tome MyoD sudjeluje u otvaranju kromatinske strukture, što omogućava vezivanje miogenina i njegovu transkripcijsku aktivnost²¹. Ovu složenost hijerarhijskih odnosa među miogenetskim regulacijskim faktorima iznio je u svom preglednom radu Singh 2013. godine²².

MARKERI SATELITSKIH STANICA

Do spoznaja o svojstvima i ulozi satelitskih stanica dolazilo se tijekom brojnih istraživanja primjenom *in vivo* i *in vitro* pokusa koristeći mnoge metode analize (pregled u Scharner²²), počevši od morfološkog ispitivanja pomoću elektronskog mikroskopa kada su ove stanice i otkrivene¹. Za identifikaciju satelitskih stanica koriste se brojni molekularni markeri koji se prikazuju imunohistokemijskim metodama, vizualizacijom upotrebom reporter gena ili primjenom protočne citometrije uz upotrebu brojnih specifičnih antitijela za površinske antigene (engl. *fluorescent activated cell sorting*; FACS). Neki od tih markera nisu specifični za satelitske stanice, ali se fenotip stanice može odrediti kombinacijom nekoliko njih.

Mirne satelitske stanice održavaju se u svom položaju i pomoću adhezijskih molekula kao što je

M-cadherin. On je jedan od najranije primijenjenih markera mirnih satelitskih stanica²⁴, mada je prisutan i u aktiviranoj stanici. Unutarstanični marker satelitskih stanica, homeobox transkripcijski faktor Pax7 također se pokazuje u gotovo svim satelitskim stanicama u fazi mirovanja, ali i u fazi aktivacije⁴. Ovaj je čimbenik potreban za samoobnavljanje satelitskih stanica, ali je esencijalan faktor za njihovo održavanje^{25,26}, kao i za održavanje njihove sposobnosti stvaranja mioblasta kroz cijeli život²⁷, mada njegova uloga u mirnom

U skeletnom mišiću, osim satelitskih stanica, izolirane su i druge matične, odnosno progenitorne stanice sa sposobnošću stvaranja mioblasta, a smještene su izvan bazalne membrane mišićnog vlakna.

stanju stanice nije posve jasna²⁸. Još neki od markera koji se pokazuju u većini satelitskih stanica su CD34 (engl. *cluster of differentiation 34*), c-met, syndecan-3/4, ali također u mirnom i aktiviranom stanju (pregled u Boldrin²⁹). Aktivirana satelitska stanica odlikuje se ekspresijom myoD regulacijskog čimbenika, ali isto tako i mioblasti koji su nastali njenom diobom.

Do većine saznanja o biologiji satelitskih stanica došlo se istraživanjima na laboratorijskim životinjama, ponajviše na mišu. Određenu subpopulaciju satelitskih stanica teško je izolirati, a već samom izolacijom one se lako aktiviraju mijenjajući time odlike mirnih satelitskih stanica³⁰. Pretpostavlja se da postoji analogija između mišjih i humanih satelitskih stanica koje je daleko teže izučavati, a još teže izolirati. Nažalost, svega je nekoliko markera kojima se one mogu identificirati u ljudi; to su također markeri kao i u miša Pax7 i M-cadherin, te CD56, odnosno NCAM (engl. *neural cell adhesion molecule*) marker (pregled u Boldrin²⁹).

Osim heterogenosti s obzirom na molekularne markere, postoji i određena funkcionalna heterogenost satelitskih stanica. Naime, one se mogu razlikovati s obzirom na brzinu dijeljenja³¹, a neke od njih imaju veću sposobnost samoobnavljanja od drugih, što se dokazalo pokusima transplantacije³². Što se podrijetla satelitskih stanica tiče, ustanovljeno je da Pax3 i Pax7 pozitivne stanice koje su

došle iz središnjeg dijela dermomiotoma embrija miša u mišićnu masu koja raste, postepeno prije rođenja zauzimaju položaj satelitskih stanica i ekprimiraju Pax7 transkripcijski faktor^{33,34}.

MOLEKULARNA REGULACIJA AKTIVNOSTI SATELITSKIH STANICA

Za satelitsku stanicu od iznimne je važnosti njeno neposredno mikrookruženje, tj. niša u kojoj je s jedne strane u neposrednom kontaktu s vlaknom, a s druge strane putem bazalne membrane s ekstracelularnim matriksom. Tako i najmanja promjena u ovoj sredini, bila ona mehanička ili kemijska, može rezultirati drugačijom sudbinom same stanice. U brojnim studijama pokušava se razjasniti molekularne i biološke mehanizme kojima s jedne strane satelitska stanica uspijeva održati mirno stanje, a s druge strane mehanizme koji reguliraju regenerativnu funkciju satelitskih stanica. Različite signalne molekule u niši satelitske stanice kontroliraju i reguliraju stanje satelitskih stanica. Regulatori procesa tijekom razvojne miogeneze, Notch i Wnt proteini, sudjeluju i u procesu regeneracijske miogeneze. Notch signaliranje pospješuje samoobnavljanje, suprimirajući myoD ekspresiju i potičući Pax7 ekspresiju^{35,36}. Dok kanonsko Wnt- β -catenin (fuzija engl. riječi *wingless* i *integrated*) signaliranje dovodi do diferencijacije mioblasta³⁷, ne-kanonsko Wnt signaliranje pospješuje samoobnavljanje satelitskih stanica³⁸.

Među ostalima i čimbenici rasta također utječu na aktivaciju satelitskih stanica i njihov regeneracijski kapacitet, a potječu iz oštećenih mišićnih vlakana, mioblasta ili upalnih stanica: hepatocitni čimbenik rasta (HGF, engl. *hepatocyte growth factor*) uključen je u aktivaciju satelitskih stanica iz mirnog stanja³⁹; neke izoforme fibroblastnog čimbenika rasta (FGF, engl. *insulin growth factor*)⁴⁰ i inzulinu slični čimbenici rasta (IGF, engl. *fibroblast growth factor*)⁴¹ pospješuju proliferaciju i diferencijaciju, dok transformirajući čimbenik rasta beta1 (TGF β 1, engl. *transforming growth factor* β 1) suprimira diferencijaciju mioblasta⁴². Mnogi čimbenici rasta i citokini djeluju na satelitsku stanicu posredstvom receptora za tirozin kinazu. Signalnim putem p38 α / β mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), potiče se proliferacija satelitske stanice dovodeći do myoD ekspresije⁴³ i posljedično daljnje procesa diferencijacije.

Također, u kontroliranju miogeneze sudjeluju i mikro-RNA (miR), a to su mali nekodirajući RNA koji reguliraju i po nekoliko mRNA. MiR-206 je specifična za mišić, a omogućava napredovanje prema završnoj diferencijaciji suprimirajući Pax7 mRNA⁴⁴. K tome postoje i mikro RNA nespecifični za mišić poput miR-31, a omogućavaju održavanje mirnog stanja satelitske stanice⁴⁵.

OSTALE STANICE KAO IZVORI MIŠIĆNIH PREKURSORA

Iako je regeneracijski potencijal odraslog skeletnog mišića ovisan o satelitskim stanicama, izolirane su i druge stanice u mišiću s miogenetskim potencijalom koje su došle iz koštane srži, iz stijenke krvnih žila u mišiću ili su smještene u intersticiju mišića. Miogenetske sposobnosti tih ne-satelitskih stanica istraživale su se u nizu pokusa *in vitro* i njihovim presađivanjem u mišiće u različitim animalnim modelima. Postoje brojne studije koje istražuju načine stvarnog doprinosa pojedinih mišićnih progenitornih stanica regeneraciji mišića u fiziološkim uvjetima, njihov odnos sa satelitskim stanicama kao i njihovo podrijetlo. Neke od njih mogu zauzeti položaj satelitske stanice i sudjelovati u stvaranju novih mišićnih vlakana pa i u stvaranju novih satelitskih stanica^{46,47}. Navodi se nekoliko vrsta takvih stanica, a neke od njih su *side population* (SP), mezangioblasti, periciti, CD133+ stanice, mezenhimске matične stanice (MSCs, engl. *mesenchymal stem cells*), *muscle derived stem cells* (MDSCs) (pregled u Peault⁴⁸ i Meregalli⁴⁹).

Side population (SP) su stanice s potencijalom stvaranja mioblasta, a prisutne su i u koštanoj srži i u mišiću^{50,51}. SP stanice su smještene u intersticiju, rijetke su i heterogene, te pokazuju različite površinske markere. Većina ih je Sca-1+ i CD45-, mada su podaci o njihovom fenotipu kontradiktorni (pregled u Kallestad⁵²).

Subpopulacija cirkulirajućih CD133+ (AC133+) matičnih stanica također ima miogenetsku sposobnost. Velika im je prednost sposobnost migracije kroz stijenke krvnih žila, a CD133+ matičnih stanica ima i u mišiću⁵³. Temeljem njihove učinkovitosti u obnovi distrofina u distrofičnim mdx miševima krenulo se 2007. godine u prvu fazu kliničkih istraživanja na malom broju dječaka koji boluju od Duchennove mišićne distrofije. Primije-

njena metoda pokazala se sigurnom za pacijente i nije dovela do nuspojava⁵⁴.

I mezangioblasti, matične stanice podrijetlom iz stijenki krvnih žila, poput AC133+ stanica, imaju miogenetski potencijal i sposobnost prolaska kroz stijenke krvnih žila. One također eksprimiraju i neke endotelne markere⁵⁵. Nakon njihove intraarterijske primjene na distrofičnim psima i miševima došlo je do stvaranja strukturalnog mišićnog proteina distrofina^{56,57}, pa se 2012. godine i s njihovom primjenom krenulo u prvu kliničku fazu na pacijentima s Duchennovom mišićnom distrofijom. Nedavno istraživanje o karakteristikama mezangioblasta još je jedna karika u lancu osnovnih istraživanja koja će možda unaprijediti terapiju mezangioblastima. Naime, otkriveno je da samo mezangioblasti s jačom ekspresijom PW1/Peg3 (engl. *PW/paternally expressed gene 3*) gena imaju sposobnost stvaranja mioblasta i sposobnost prolaska kroz stijenku krvne žile⁵⁸. Ipak, sve ove stanice su multipotentne, pa postoji mogući problem usmjeravanja i prema nastanku neke druge vrste stanica⁵⁹. Miogenetska sposobnost stanica koje potječu od stijenke krvnih žila povezuje se s embrionalnim zajedničkim pretkom skeletnih mišića i glatkih mišića krvnih žila. Naime, mezangioblasti potječu od stijenke embrionalne dorzalne aorte čije stanice imaju zajedničko podrijetlo sa stanicama miotoma, prvog skeletnog mišića koji se stvori u somitu mišjeg embrija⁶⁰.

TERAPIJSKA PRIMJENA PROGENITORNIH MIŠIĆNIH STANICA U MIŠIĆNIM OBOLJENJIMA

Značajni se naponi ulažu u liječenje mišićnih distrofija. U liječenju tih oboljenja nastoji se poboljšati stanje u mišiću i primjenom terapije transplantacije matičnih stanica ili mioblasta, koje bi se uz prethodnu izolaciju i ekspanziju *in vitro* fuzionirale s distrofičnim mišićnim vlaknom. Usprkos brojnim terapijskim i eksperimentalnim nastojanjima, za Duchennovu mišićnu distrofiju, oboljenje koje zahvaća sve mišiće, do danas još ne postoji lijek. U ovom oboljenju dolazi do oštećenja mišićnih vlakana zbog mutacija na genu za distrofin, a pokušaji mišićne regeneracije dovode do stvaranja veziva i masti. Stanice koje bi bile idealne za transplantaciju u takvih pacijenata su sate-

litske stanice, jer imaju sposobnost stvaranja mio-blasta i sposobnost samoobnavljanja. K tome, u fiziološkim uvjetima satelitske stanice su glavni izvor za nove mioblaste tijekom regeneracije⁶¹. Naime, u pokusima u kojima je genetskim inženjstvom izazvana ablacija Pax7 pozitivnih stanica (u mišiću Pax7 pozitivne su jedino satelitske stanice) nije došlo do regeneracije mišića, što znači da su upravo te stanice esencijalne za regeneraciju u akutnoj ozljedi⁶¹. No uspješnost liječenja mišićnih oboljenja transplantacijom satelitskih stanica jako je slaba. Za sada je teško izolirati humane satelitske stanice. I mišje satelitske stanice kod kojih je ta mogućnost veća, ekspanzijom *in vitro* jako brzo se diferenciraju u mioblaste³⁰. Naprednijom tehnologijom uspjelo se u miša izolirati čitavo neoštećeno mišićno vlakno s određenim subpopulacijama satelitskih stanica čija je neposredna transplantacija u mišić miša dovela do nastajanja novih mišićnih vlakana i njima pripadajućih satelitskih stanica⁶². No, takva metoda bila bi teško primjenjiva u ljudi⁶³. S druge strane, mioblasti koje je za razliku od satelitskih stanica lakše uzgojiti u kulturi tkiva, nemaju sposobnost duljeg preživljavanja u mišiću primaoca^{64,65}. Također je problem mala količina satelitskih stanica koje se mogu dobiti mišićnom biopsijom, a trebale bi se primijeniti na veliku mišićnu masu u mišićnim distrofijama²⁹. Nedostatak satelitskih stanica je i nemogućnost njihove sistemske primjene zbog nesposobnosti prolaska kroz endotelnu stijenku krvnih žila⁶³.

Nakon brojnih uspješnih pretkliničkih istraživanja početkom devedesetih godina krenulo se i u prve faze kliničkih ispitivanja transplantacije mioblasta u pacijenata s Duchenovom mišićnom distrofijom koja nažalost nisu dovela do očekivanih poboljšanja. Neuspjeh se može pripisati prije navedenim problemima i nedostacima, a također i lošem djelovanju imunosupresijskih lijekova na mioblaste⁶⁶.

Stoga se radi na poboljšanju uvjeta medija za kulturu stanica kao i stanja mikrookoliša u mišiću domaćina kako bi stanice zadržale svojstvo matičnih stanica te dulje preživjele u mišiću domaćina. Također je važna izolacija stanice s takvim obilježjima koja će omogućiti samoobnavljanje, ali i jaku proliferaciju mioblasta. Zbog ovih poteškoća u transplantaciji satelitskih stanica pokušalo se s

transplantacijama i drugih mišićnih progenitornih stanica. Bazična i pretklinička postignuća u tom smislu te aktualna klinička ispitivanja izložili su Tedesco i Cossu u svom preglednom radu 2012. godine⁶⁶. Ukratko, mada se na animalnim modelima eksperimentiralo s mnogim mišićnim progenitornim stanicama, do kliničkih faza istraživanja došlo se jedino s transplantacijom mezangioblasta i mioblasta nastalih iz satelitskih stanica. Za tretman satelitskim stanicama odabrane su okulofaringealna distrofija te urinarna i analna inkontinencija, budući da se radi o jednom ili nekoliko mišića u koje treba transplantirati autologne mioblaste (iz satelitskih stanica) iz zdravih mišića. U dvanaest pacijenata koji boluju od okulofaringealne mišićne distrofije ovakva transplantacija pokazala se sigurnom i dovela do poboljšanja kvalitete života, a samu metodu se i dalje nastoji unaprijediti⁶⁸. Transplantacije mioblasta u ljudi s urinarnom i analnom inkontinencijom provode se u okviru kliničkih istraživanja u nekoliko kliničkih centara u svijetu, a rezultati su ohrabrujući (pregled u Tedesco⁶⁷). U nastojanjima poboljšanja stanja u oboljenjima u kojima je zahvaćen velik broj mišića, kao što je slučaj u Duchennovoj mišićnoj distrofiji, potrebna je sistemska primjena stanica. Stoga je 2012. godine, nakon uspješnih pretkliničkih studija^{56,57}, započela prva faza kliničkih ispitivanja (Eudra CT br. 2011-000176-33) u kojima se testiraju mezangioblasti koji potječu od HLA-identičnog donora (engl. *human leukocyte antigen*) injicirani intraarterijski, uz primjenu adekvatne imunosupresijske terapije⁶⁷.

Iako se zahvaljujući brzom napretku tehnologije dosta spoznalo o molekularnim mehanizmima koji reguliraju stanje satelitskih stanica, ipak još uvijek mnogo toga ostaje za razjasniti, kako o njima samima, tako i o njihovom odnosu s ostalim mišićnim progenitornim stanicama, posebice u fiziološkim uvjetima odvijanja miogeneze tijekom procesa mišićne regeneracije. Stoga se provode brojna istraživanja sa svrhom unapređenja moguće terapijske primjene mišićnih progenitornih stanica u nekim mišićnim oboljenjima ili u stanjima u kojima treba omogućiti bolju mišićnu regeneraciju.

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

LITERATURA

1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:493-95.
2. Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* 1971;170:421-35.
3. Bischoff R. Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture. *Med Sci Sports Exerc* 1989;21: S164-72.
4. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;6:777-86.
5. Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes & Development* 1994;8: 1-8.
6. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987;51:987-1000.
7. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun t, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993;75:1351-9.
8. Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1995;172:37-50.
9. Smith TH, Block NE, Rhodes SJ, Koniczny SF, Miller JB. A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somatic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development* 1993;117:1125-33.
10. Londhe P, Davie JK. Sequential association of myogenic regulatory factors and E proteins at muscle-specific genes. *Skeletal Muscle* 2011;1:14.
11. Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 2000;48:225-68.
12. Kassam-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* 2004;431:466-71.
13. Zhao P, Hoffman EP. Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn* 2004;229:380-92.
14. Relaix F, Montarras S, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S et al. Pax3 and Pax7 have distinct overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 2006;172:91-102.
15. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000;151:1221-34.
16. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 1994;164:588-603.
17. Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 1999;112:2895-01.
18. Zhou Z, Bornemann A. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2001;22: 311-6.
19. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 2006;119:1824-32.
20. Ustanina S, Carvajal J, Rigby P, Braun T. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells* 2007;25:2006-16.
21. Cao Y, Yao Z, Sarkar D, Lawrence M, Sancsej SJ, Parker MH. Genome-wide Myod binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Dev Cell* 2010;18:662-74.
22. Singh K, Dilworth J. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J* 2013;280:3991-4003.
23. Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. 2011;1:28.
24. Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn* 1994; 199:326-37.
25. Ustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* 2004;23:3430-9.
26. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfening A, Van Wittenbergh L, Paldi A, Gayraud-Morel B et al. Pax-7 expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 2011;138:3647-56.
27. Günther S, Kim J, Kostin S, Lepper C, Fan CM, Braun T. Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;13:590-601.
28. Montarras D, L'honoré A, Buckingham M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J* 2013;280:4036-50.
29. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? *J Histochem* 2010;58: 941-55.
30. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cuman A et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005; 309:2064-7.
31. Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 1996;175:84-94.
32. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144:1113-22.
33. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. Divergent functions of murine Pax3 i Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev* 2004;18:1088-105.
34. Kassam-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 2005;19:1426-31.
35. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* 2012;32:2300-11.
36. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007;129:999-1010.
37. Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to wnt signaling in muscle

- stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2008;2:50-9.
38. Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scime A, Rudnicki MA. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:535-47.
 39. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 1998;194:114-28.
 40. Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cell in young and old rats. *J Histochem Cytochem* 1999;47:23-42.
 41. Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FV. IGF-1 restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000;89:1365-79.
 42. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007;13:204.
 43. Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV et al. The p38 α /beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol* 2005;169:105-16.
 44. Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X et al. MicroRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* 2010;190:867-79.
 45. Crist CG, Montarras D, Buckingham M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* 2012;11:118-26.
 46. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L et al. Perycytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:255-67.
 47. 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;4:217-25.
 48. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance and therapy. *Molecular therapy* 2007;5:867-77.
 49. Meregalli M, Farini A, Belichi M, Parolini D, Cassinelli I, Razini P et al. Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy. *FEBS J* 2013;425:1-62.
 50. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-4.
 51. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123-34.
 52. Kallestad KM, McLoon L. Defining the heterogeneity of skeletal muscle-derived side and main population cells isolated immediately ex vivo. *J Cell Physiol* 2009;676:84.
 53. Torrente Y, Belicchi A, Sampaolesi M, Pisati F, Lestingi M, D'Antona G et al. Human circulating AC133+ stem cells replenish the satellite cells replenish the satellite cell pool, restore dystrophin expression and ameliorate function upon transplantation in murine dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:182-95.
 54. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D'Antona G, Cogiamanian F, Pisati F et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cell in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant* 2007;16:563-77.
 55. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A et al. The mesoangioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 2002;129:2773-83.
 56. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A et al. Mesangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;444:574-9.
 57. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesangioblasts. *Science (NY)* 2003;301:487-92.
 58. Bonfanti C, Rossi G, Tedesco FS, Giannotta M, Benedetti S, Tonlorenzi R et al. PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesangioblast stem cell competence. *Nat Commun* 2015;6:6364.
 59. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2008;2:22-31.
 60. Esner M, Meilhac SM, Relaix F, Nicolas JF, Cossu G, Buckingham M. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development* 2005;133:737-49.
 61. Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 2011;138:3639-46.
 62. Collins A, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005;122:289-301.
 63. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:11-9.
 64. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblast in myoblast transfer therapy. *Muscle nerve* 1996;19:853-60.
 65. Grounds MD, Relaix F. Myogenic precursor cells. In: Karpaty G, Hilton-Jones D, Bushby K, Griggs C (eds). *Disorders of Voluntary Muscle*. 8th ed. Cambridge University Press, 2009:20-36.
 66. Skuk D. Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1871-85.
 67. Tedesco FS, Cossu G. Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol* 2012;25:597-603.
 68. Périé S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol Ther* 2014;22:219-25.