

Received: 2005.02.21
Accepted: 2005.05.23
Published: 2005.06.20

Transplantacje komórek mięśniowych – oczekiwania, możliwości i ograniczenia*

Muscle cell transplantations: The ups and downs

Anna Burdzińska, Sybilla Berwid, Arkadiusz Orzechowski

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

Transplantacje komórkowe skupiają ostatnio coraz większe zainteresowanie jako potencjalna metoda leczenia chorób związanych z upośledzeniem funkcji mięśni. Prekursory komórek mięśniowych można stosunkowo łatwo pozyskać, także od dorosłych osobników i hodować *in vitro*, co daje nadzieję na możliwość szerokiego stosowania takich metod w przyszłości. Najwięcej badań dotyczy przeszczepów komórkowych w leczeniu dystrofii mięśniowych i prób usprawnienia pracy niewydolnego mięśnia sercowego. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem komórek mięśniowych w przypadkach nietrzymania moczu. W przypadku dystrofii mięśniowych obiecujące wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych nie znalazły dotychczas potwierdzenia w próbach klinicznych przeprowadzanych u ludzi. Bardziej optymistyczne są osiągnięcia medycyny transplantacyjnej w odniesieniu do komórek mięśniowych wprowadzonych do miokardium. Zabiegi takie dawały pozytywne skutki po ich wykonaniu zarówno na modelach doświadczalnych, jak i w próbach klinicznych. Jednakże, przeprowadzenie transplantacji komórkowych nadal wiąże się z poważnymi problemami. Najważniejszym z nich jest słaba przeżywalność komórek po przeszczepie. Większość komórek ginie w pierwszych godzinach lub dniach po wprowadzeniu do organizmu biorcy. W ostatnich latach prowadzi się intensywne badania nad opracowaniem strategii, która zwiększyłaby efektywność transplantacji. Podejmuje się próby wykorzystania przeszczepów autologicznych, osłabienia reakcji zapalnej biorcy, poszukuje subpopulacji komórek, która wykazywałaby zwiększoną przeżywalność, a także przeprowadza się manipulacje genetyczne na wstrzykiwanych komórkach lub ich hartowanie.

Słowa kluczowe:

transplantacje komórek mięśniowych • komórki satelitowe • przeżywalność komórek

Summary

Cell transplantation is believed to be an attractive technique among the various prospective methods of healing muscle wasting and other degenerative diseases. Muscle precursor cells can be obtained and cultured *in vitro* relatively easily, making possible a wide application of this method in the near future. A number of research efforts regarding cell transplantation for the recovery of dystrophic muscles and attempts to accelerate convalescence of disabled heart muscle are underway. There are also initiatives to use muscle cells in the repair of urinary incontinence. In the case of muscle dystrophy, very promising results were achieved in animal models, but the procedure has proved unreliable in clinical tests on humans. More convincing results were obtained from muscle cells transferred to myocardium. This procedure gave positive response in

* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Komitetu Badań Naukowych w ramach grantu SPB/COST/P-06/DWM 10/2005-2007, realizowanego w ramach Akcji COST 925 zatytułowanej "The importance of prenatal events for postnatal muscle growth in relation to the quality of muscle based foods".

both animal models and clinical trials. However, there are still several obstacles to transplant muscle cells. First there is the poor viability of muscle cells after transfer. This results in sudden cell death, which occurs within a few hours after the cells are transferred to the recipient. A major concern recently is to develop procedures which will improve the efficacy of muscle cell transplantation. Growing interest is focused on autologous cell transplantation owing to the low immunogenicity of this kind of transfer. Moreover, numerous attempts are underway to suppress inflammation at the site of cell deposition or to search for subpopulations of cells which would result in a higher survival rate after transfer. Furthermore, genetic manipulations or preconditioning of muscle cells prior to transfer are often performed.

Key words: muscle cells transplantation • satellite cells • cell survival

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7677.pdf

Word count: 4328

Tables: –

Figures: 2

References: 85

Adres autora: dr hab. Arkadiusz Orzechowski, profesor SGGW, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa;
e-mail: orzechowski@alpha.sggw.waw.pl

Wykaz skrótów: **APO-1/FasL/CD95** – ligand Fas; **C2C12** – linia klonalna mysich komórek satelitowych; **CD4** – antygen powierzchniowy limfocytów T pomocniczych; **CD8** – antygen powierzchniowy limfocytów T cytotoksycznych; **DGC** – kompleks dystrofino-glikoproteinowy; **DMD** – dystrofia mięśniowa Duchenne'a; **ICAM** – cząsteczka przylegania międzykomórkowego; **IL-1** – interleukina 1; **IL-1R** – receptor interleukiny 1; **LFA-1** – antygen związany z funkcją leukocytów; **MDX** – dystrofia mięśniowa myszy związana z chromosomem X; **MPC** – prekursorowe komórki mięśniowe; **PI-3K** – 3-kinaza fosfatydoinozitolu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RFA** – reaktywne formy azotu; **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta; **VEGF** – śródbłonkowy czynnik wzrostu

Transplantologia komórkowa to dziedzina dynamicznie się rozwijająca i skupiająca ogromne zainteresowanie w ostatnich latach. Przeszczepy narządowe ratują życie wielu chorym, jednak liczba przeprowadzanych zabiegów i ich efektywność jest niewystarczająca. Ograniczenia są spowodowane niewielką liczbą potencjalnych dawców oraz zjawiskiem odrzucania przeszczepów. Reakcja immunologiczna może zachodzić dwukierunkowo. Odrzucenie niezgodnego antygenowo narządu przez biorcę jest bardzo powszechne, jednak również przeszczep, zwłaszcza zawierający znaczną liczbę limfocytów T, może indukować reakcję przeciw biorcy [3]. Stosowanie nawet silnych środków immunosupresyjnych często nie zapewnia przyjęcia immunogennej tkanki. Problemy związane z przeprowadzaniem i przyjmowaniem się przeszczepów narządowych były bodźcem do rozpoczęcia badań nad alternatywnymi metodami transplantacji. Inspiracją do rozpoczęcia prac z zakresu transplantacji komórkowych była dobrze znana, przeprowadzana z powodzeniem od ponad 50 lat procedura przeszczepiania szpiku kostnego. Zrodziła się nadzieja, że przynajmniej w niektórych przypadkach, możliwe będzie zastąpienie przeszczepu całego narządu przez wstrzyknięcie odpowiedniej liczebnie populacji określonego typu komórek. Jest również wiele chorób, w których przeszczepy narządowe nie znajdują zastosowania, natomiast transplantacje komórkowe mogą stać się alternatywną metodą ich leczenia, np. niewydolność zwieracza cewki moczowej [81] lub choroby neurodegeneracyjne [30].

WYBÓR KOMÓREK DO PRZESZCZEPU

Poszukuje się różnych źródeł komórek, które nadawałyby się do przeprowadzania transplantacji. Rozważa się możliwość wykorzystania komórek zarodkowych, krwi pępowinowej, czy też komórek macierzystych występujących u dojrzałych osobników np. w szpiku kostnym. Istnieje pogląd, że komórki macierzyste szpiku kostnego, mimo że występują w dorosłym organizmie, pozostają multipotencjalne i cechują się plastycznością, tzn. mogą się różnicować w różne linie komórkowe w zależności od docierających do nich sygnałów [14,52]. Są dowody, że komórki pochodzące ze szpiku kostnego mogą zasiedlać i brać udział w odbudowie narządów, takich jak serce, wątroba, mózg czy mięśnie. Teoria plastyczności hematopoetycznych komórek macierzystych daje nadzieję, że mogłyby one być dobrym materiałem do transplantacji w celu regeneracji różnych narządów, nie tylko szpiku kostnego [26]. Istnieje jednak również alternatywna teoria, która twierdzi, że plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych jest artefaktem [27]. Badacze opowiadający się za ostatnią wymienioną wersją zdarzeń twierdzą, że szpik kostny, oprócz hematopoetycznych komórek macierzystych, zawiera inne, niewielkie populacje komórek, które są już ukierunkowane tkankowo i nie podlegają transdiferencjacji (tzn. że istnieją w szpiku np. komórki neurogenne, które mogą się rozwijać jedynie według schematu charakterystycznego dla komórek nerwowych). Dowodzą także, że komórki takie są

uwalniane do krwiobiegu i mogą zasiedlać odpowiednie narządy dzięki sygnałom chemicznym wysyłanym przez uszkodzone tkanki. W prawidłowych warunkach jednak liczba tych komórek jest u ssaków niewielka i dodatkowo zmniejsza się wraz z wiekiem [55].

TRANSPLANTACJE KOMÓREK MIOGENNYCH – PIERWSZE PRÓBY ZWIĄZANE Z LECZENIEM DYSTROFII MIĘŚNIOWYCH

Zainteresowanie badaczy skupia się jednak nie tylko na komórkach macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego. Ze względu na stosunkowo łatwe sposoby pozyskiwania, dużo uwagi poświęca się już od wielu lat komórkom miogennym. Komórkami macierzystymi mięśni szkieletowych są komórki satelitarne leżące na obrzeżach włókien pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną. Ta populacja prekursorów komórek mięśniowych (muscle precursor cells – MPCs) stanowi potencjał regeneracyjny postmitotycznej tkanki mięśnia szkieletowego i jest postrzegana jako materiał, który może być wykorzystany do transplantacji komórkowych. Istnieje wiele chorób, u podłoża których leży upośledzenie czynności włókien mięśniowych (np. dystrofie mięśniowe, niewydolność mięśnia sercowego), więc teoretycznie przeszczepy komórek satelitarnych mogłyby mieć liczne zastosowania.

Pierwsze doświadczenia z przeszczepianiem komórek pochodzenia mięśniowego przeprowadzono pod koniec lat 70 ubiegłego wieku [50]. Dziesięć lat później rozpoczęto badania nad przydatnością transplantacji komórkowych w dystrofiach mięśniowych z użyciem modeli zwierzęcych [29,51]. Dystrofie mięśniowe to grupa obejmująca kilkanaście genetycznie uwarunkowanych, często śmiertelnych i jak dotąd nieuleczalnych chorób, takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne’a lub Beckera. Istotą wymienionych chorób jest upośledzenie ekspresji białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek mięśniowych. Następstwem jest postępujący zanik wszystkich lub poszczególnych grup mięśni w organizmie i kończy się kalectwem, a nawet śmiercią. Najczęściej występujący i najlepiej poznany typ dystrofii to dystrofia mięśniowa Duchenne’a (DMD). Chorzy przejawiają niewielką lub zupełny brak ekspresji dystrofiny – białka cytoszkieletu wchodzącego w skład kompleksu dystrofino-glikoproteinowego (dystrophin-glycoprotein complex – DGC), który stabilizuje sarkolemmę podczas skurczu. Włókna mięśniowe bez dystrofiny nie wytrzymują mechanicznych napięć podczas pracy mięśnia i ulegają degeneracji. Początkowo ubytki włókien są uzupełniane przez ulegające fuzji komórki satelitarne. Ostatecznie jednak bardzo aktywne u chorych na dystrofię mięśniową komórki satelitarne wyczerpują swój potencjał do proliferowania i odbudowywania włókien. Wówczas miejsce uszkodzonej tkanki mięśniowej zajmuje nieodwracalnie tkanka łączna, która upośledza podstawowe funkcje mięśni. Istniały nadzieje, że wstrzyknięcie mioblastów pochodzących od zdrowych dawców, a więc mających zdolność formowania dystrofiny, pozwoli na fuzowanie prawidłowych komórek z włóknami biorcy i tym samym zwiększy wytrzymałość upośledzonego mięśnia. Początkowe doświadczenia na modelach zwierzęcych dawały obiecujące wyniki. Badania na dystroficznych myszach mdx (murine X-linked dystrophy), które są modelem zwierzęcym dystrofii mięśniowej Duchenne’a, wykazały, że wstrzyknięcie prawidłowych mioblastów przyczynia się do zwiększenia ekspresji

dystrofiny we włóknach mięśniowych [51]. Podobne wyniki uzyskano na innym modelu zwierzęcym – myszach dy/dy wykazujących niedobór białka adhezyjnego macierzy zewnątrzkomórkowej lamininy $\alpha 2$, które – podobnie jak dystrofina – stanowi część DGC. U ludzi defekt genu kodującego to białko powoduje wrodzoną dystrofię mięśniową z niedoborem merozyny. Podanie mioblastów od zdrowych myszy spowodowało wzrost ekspresji brakującego białka u myszy dy/dy wokół miejsca przeszczepu [74].

W 1990 r. zdecydowano o przeprowadzeniu wstępnych prób klinicznych na ludziach [49]. Niestety, rezultaty tych badań były dalekie od oczekiwanych. Nie udało się dowieść pozytywnych skutków przeszczepienia prekursorów prawidłowych komórek mięśniowych do mięśni osób chorych na dystrofię mięśniową [37,40,49,73]. Okazało się, że najpoważniejszy problem związany z transplantacją mioblastów to słaba przeżywalność komórek po przeszczepie i brak możliwości dystrybucji przeszczepionych komórek po całym organizmie [49].

Przeprowadzane przeszczepy były alogeniczne, a zatem z założenia wstrzykiwane komórki były immunogenne dla gospodarza. W takich sytuacjach system odpornościowy szybko i skutecznie eliminuje wprowadzone komórki. Teoretycznie, przeżywalność przeszczepianych mioblastów może być wydłużona przez wywołanie immunosupresji u biorcy, to jednak, jak wiadomo, powoduje wiele niepożądanych skutków zagrażających zdrowiu a nawet życiu chorego [9].

W badaniach przeprowadzanych na dziesięciu chłopcach z DMD po wstrzyknięciu 100 milionów mioblastów w mięsień piszczelowy przedni tylko u jednego pacjenta stwierdzono obecność przeszczepionych komórek 6 miesięcy po zabiegu, pomimo ciągłego stosowania cyklosporyny [39]. Oznacza to, że czas przeżycia komórek po transplantacji jest ograniczony nawet wówczas, gdy reakcja immunologiczna biorcy jest hamowana. Nawet comiesięczne nastrzykiwanie dystroficznych mięśni zdrowymi mioblastami nie doprowadziło do żadnej klinicznej poprawy stanu pacjenta [37].

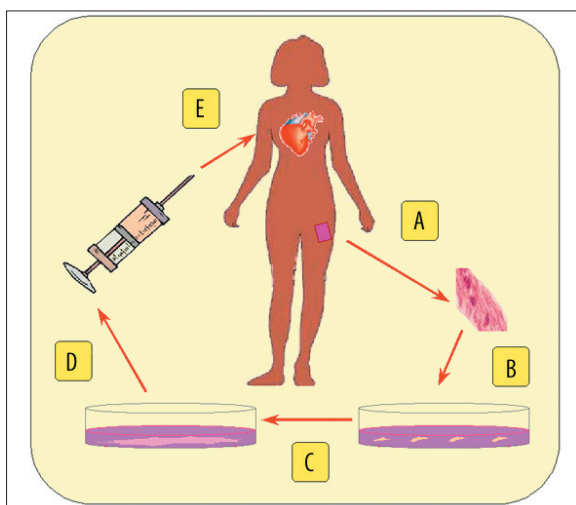
CZY KOMÓRKI MIĘŚNIOWE MOGĄ USPRAWNIAĆ MIĘŚNIE SERCOWE PO ZAWALE?

Ponieważ jedną z głównych przyczyn wcześniejszych porażek transplantacji MPCs była m.in. słaba dystrybucja komórek poza miejsce wstrzyknięcia, wysiłki skupiono na próbach przywrócenia sprawności mięśniom uszkodzonym miejscowo. Na pierwszy plan wysunęła się nadzieja na transplantację komórek mięśniowych do pozawałowego obszaru w mięśniu sercowym. U traszek (*Triturus sp.*) wycięcie nawet 50% mięśnia sercowego indukuje spontaniczną regenerację i odbudowę narządu. Niestety, u ssaków, komórki mięśnia sercowego podobnie jak neurony i włókna mięśni szkieletowych należą do tkanek, które tracą zdolność do wykonywania podziałów w okresie postnatalnym [56]. Co prawda teoria, że kardiomiocyty dorosłych osobników są niezdolne do wykonywania podziałów została niedawno obalona [5], jednak odsetek komórek ulegających mitozie jest tak niewielki, że w mięśniu sercowym po zawale w miejscu uszkodzenia tworzy się przede wszystkim łącznotkankowa blizna, a nie zregenerowana tkanka mięśniowa [85].

W krajach wysoko rozwiniętych choroby serca są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów. W Polsce zawał serca zdarza się u około 100 tysięcy osób rocznie, z czego 40% umiera przed upływem roku po zawale. Wiadomo ponadto, że ze względu na tryb życia i dodatkowe czynniki ryzyka (np. dieta) problem będzie się raczej nasilał w kolejnych latach. Perspektywa, że przeszczepy mioblastów do mięśnia sercowego mogą polepszyć skuteczność leczenia chorych na zawał mięśnia sercowego była kusząca dla naukowców i klinicystów. Zasadniczym celem stało się zastąpienie pozawałowego obszaru tkanką kurczliwą, która przywróciłaby prawidłową kinetykę serca. Rozpoczęto próby na modelach zwierzęcych. Początkowo przeszczepiano kardiomiocyty płodowe lub pochodzące od noworodków, wychodząc z założenia, że prawdopodobieństwo utworzenia czynnościowego syncytium między komórkami pochodzącymi z mięśnia sercowego i miokardium biorcy teoretycznie powinno być duże. W badaniach na szczurach wykazano obecność komórek dawcy w miejscu wstrzyknięcia 2 miesiące po wykonaniu przeszczepu [11,33]. Przeszczepione komórki wykazywały ekspresję koneksyny 43, białka budującego koneksyny, czyli tzw. ściśle złącza umożliwiające natychmiastowe przekazywanie stanu czynnego pomiędzy kardiomiocytami. Koneksyny pozwalają na przewodzenie bodźca między komórkami i tym samym przyczyniają się do integracji i synchronizacji przestrzennej skurczu mięśnia sercowego. Obecność koneksyny 43 w przeszczepionych komórkach dawała nadzieję, że utworzą one połączenia z kardiomiocytami biorcy, a przez to włączą się w cykl pracy serca. Jednak nawet w przypadkach, w których nie wykazano takich połączeń, po zabiegu wstrzyknięcia komórek obserwowano usprawnienie funkcji serca. Ściana komory po transplantacji była grubsza a objętość wyrzutowa serca większa niż u zwierząt kontrolnych [41]. Pomimo obiecujących wyników poszukiwano alternatywnych źródeł komórek do przeszczepu, ze względu na ograniczone możliwości pozyskania kardiomiocytów od ludzi. Transplantacje ksenogeniczne, czyli międzygatunkowe, są zdecydowanie zbyt immunogenne, natomiast pozyskanie na szeroką skalę ludzkich kardiomiocytów w chwili obecnej jest raczej niemożliwe. Zainteresowanie badaczy skupiło się na komórkach satelitowych mięśni szkieletowych. Przecież pomimo różnic morfologicznych i fizjologicznych mięsień sercowy, tak jak mięsień szkieletowy jest mięśniem poprzecznie prążkowanym. Niezróżnicowane komórki mięśni szkieletowych dają się natomiast izolować zarówno od młodych jak i dorosłych organizmów, choć z wiekiem ich liczba znacząco się zmniejsza. Mają stosunkowo duży potencjał proliferacyjny i są komórkami miogennymi, a więc w dużej mierze zdeterminowanymi narządowo, co teoretycznie mniejsza ewentualne ryzyko nowotworzenia po przeszczepie. Dodatkowo, są stosunkowo mało wrażliwe na niedotlenienie, co zwiększa ich szansę przeżycia w nieprzyjnym środowisku blizny pozawałowej [34]. Podstawowym warunkiem powodzenia terapii pozostaje przeżycie komórek po transplantacji i ich zróżnicowanie się w zdolne do wykonywania skurczów struktury. Czy komórki satelitowe spełniają ten wymóg? W badaniach, które pozwoliły śledzić przez 3 miesiące los przeszczepionych do serca mioblastów stwierdzono, że już kilka dni po przeszczepie, komórki zaczynają łączyć się w wielokomórkowe miotuby charakterystyczne dla mięśni szkieletowych. Wykazywały one ekspresję ciężkiego łańcucha miozyny typu szybkiego, charakterystycznego dla dojrzałych włókien

mięśni poprzecznie prążkowanych. W dalszych etapach widoczne było też uporządkowane i równoległe ułożenie białek kurczliwych w sarkomerach. Nie stwierdzono natomiast w przeszczepionych komórkach ekspresji białka MHC- α , będącego markerem kardiomiocytów, ani sercowej troponiny I, N-kadheryny czy też koneksyny 43 [60]. A zatem komórki satelitowe po przeszczepie do mięśnia sercowego nie ulegają różnicowaniu do kardiomiocytów, tylko rozwijają się zgodnie ze scenariuszem typowym dla komórek mięśni szkieletowych. Ostatecznie jednak tworzą kurczliwe struktury, które przynajmniej teoretycznie mogą synchronicznie współpracować z mięśniem sercowym i tym samym powodować kliniczną poprawę wydolności serca. Nasuwa się pytanie, czy komórki satelitowe dawcy są w stanie utworzyć elektromechaniczne połączenia z kardiomiocytami biorcy? Co wydaje się interesujące, w niezróżnicowanych szczurzych mioblastach hodowanych *in vitro* wykazano ekspresję N-kadheryny i koneksyny 43, jednak ekspresja ta malała wraz ze stopniem zróżnicowania komórek. W badaniach *in vivo* przeszczepione do serca mioblasty w ogóle nie ekspresjonowały białek budujących typowe dla serca połączenia międzykomórkowe [57].

W świetle opisanych badań niemożliwe wydaje się więc tworzenie typowych dla mięśnia sercowego koneksionów pomiędzy kardiomiocytami biorcy a miocytami dawcy. Zastanawiano się, czy istnieje jakiś inny mechanizm współdziałania między tymi komórkami. Wiadomo na przykład, że możliwe jest łączenie się różnych rodzajów komórek. Postanowiono przeprowadzić badania, które w zamierzeniach miały zweryfikować istnienie takiej interakcji czynnościowej między kardiomiocytami a komórkami satelitowymi. W hodowli *in vitro* już po 3 dniach inkubacji szczurzych kardiomiocytów transfekowanych genem *n-lac* (beta-galaktozydaza) z mysimi komórkami satelitowymi linii klonalnej C2C12 powstawały miotuby wykazujące obecność *n-lac*. Potwierdzono możliwość takiej fuzji również w badaniach *in vivo* na myszach [58]. Czy jednak tworzenie takich struktur może zapewnić integralność funkcjonalną przeszczepu z narządem biorcy? Leobon i wsp. dowiedli, że miotuby powstające ze wstrzykniętych komórek macierzystych mięśni szkieletowych kurczą się zupełnie niezależnie od sąsiadujących kardiomiocytów [32]. Jednak, mimo że wydaje się, że komórki satelitowe przeszczepione do mięśnia sercowego nie współpracują synchronicznie z kardiomiocytami, to istnieje wiele doniesień dowodzących istnienia realnej poprawy klinicznej po takich transplantacjach. Prowadzono liczne badania na modelach zwierzęcych np.: szczurach [2], królikach [4], owcach [13]. Wywoływano doświadczalnie zawał mięśnia sercowego poprzez podwiązanie tętnic wieńcowych i w powstały obszar ostrego niedotlenienia wstrzykiwano komórki satelitowe. Stwierdzono wzrost kurczliwości komór i zwiększenie frakcji wyrzutowej serca po transplantacji w stosunku do zwierząt kontrolnych, a poprawa funkcjonowania mięśnia sercowego utrzymywała się nawet rok po przeszczepie. Wyniki były na tyle obiecujące, że rozpoczęto próby kliniczne na ludziach. Jak wcześniej wspomniano, możliwe jest pozyskanie komórek satelitowych także od dorosłych osobników. Umożliwiało to wykonywanie transplantacji autologicznych (ryc. 1). To poważny atut, bowiem własne komórki nie są immunogenne, a zatem powinny lepiej przeżywać w miejscu podania. Menasche i wsp. w 2000 roku przeprowadzili autologiczny przeszczep komórek sateli-



Ryc. 1. Schemat autologicznego przeszczepu komórek satelitowych do miokardium, A – pobranie fragmentu mięśnia szkieletowego, B – izolacja komórek satelitowych z uzyskanej tkanki, C – namnażanie izolowanych komórek *in vitro* i ewentualne manipulacje na pozyskanej populacji (np. terapia genowa, hartowanie), D – wstrzyknięcie zawiesiny komórek do mięśnia sercowego

towych u 72-letniego mężczyzny z niewydolnością serca spowodowaną zawałem. Pacjent po 5 miesiącach od przeszczepu komórek wykazywał poprawę kliniczną i wzrost kurczliwości ściany komory, którą wcześniej uległa martwicy i zbliźnowaceni [35]. Wstępne obserwacje dotyczące pozytywnego wpływu transplantacji komórek satelitowych do mięśnia sercowego zostały potwierdzone na większych grupach pacjentów [35,64]. Przeprowadzono też pierwsze próby nieinwazyjnego wprowadzenia komórek do mięśnia sercowego u ludzi. Wstrzykiwano je z powodzeniem przezskórnie za pomocą systemu kateterów wprowadzonych do żył wieńcowych [63].

Dotychczasowe badania przemawiają za tym, że transplantacje komórek satelitowych do niewydolnego mięśnia sercowego poprawiają parametry jego działania, jednak mechanizm tego oddziaływania wciąż pozostaje niezany. Wydaje się, że jest to związane ze zdolnościami wstrzykiwanych komórek do tworzenia struktur kurczliwych, co udowodniły badania Hutchesona i wsp., którzy porównali efektywność przeszczepu mioblastów i fibroblastów. Tylko komórki miogenne wzmocniły kurczliwość mięśnia sercowego [22]. Porównano również wyniki transplantacji kardiomiocytów płodowych i mięśniowych komórek satelitowych i stwierdzono podobną skuteczność terapeutyczną obu typów komórek [62]. Zatem niemożność tworzenia ścisłych złączy między komórkami dawcy i biorcy prawdopodobnie nie wpływa na efektywność przeszczepu. Musi więc istnieć inny niż zależny od koneksionów mechanizm, który powoduje, że wstrzyknięte komórki miogenne usprawniają czynność serca. Uważa się, że skurcz włókien poprzecznie prążkowanych, które powstają w ścianie komory po przeszczepie, może być indukowany przez ich mechaniczne odkształcenie w chwili skurczu otaczających je kardiomiocytów [34]. Dodatkowo, pomimo że dotychczas nie znaleziono przekonujących dowodów, rozważa się możliwość wydzielania przez wprowadzone komórki cytokin i czynni-

ków wzrostowych, które mogłyby powodować przebudowę niedotlenionej tkanki i nasilać angiogenezę w uszkodzonym obszarze i w ten sposób przyczynić się do poprawy parametrów pracy mięśnia sercowego [34].

KOMÓRKI MIĘŚNIOWE – NOWY MATERIAŁ DO WSTRZYKNIĘĆ OKOŁOCEWKOWYCH W LECZENIU NIETRZYMANIA MOCZU

Mięśniowi sercowemu jako tkance docelowej dla przeszczepianych mioblastów poświęca się najwięcej uwagi, niewątpliwie jednak transplantacje komórek satelitowych mogą być korzystne również w innych okolicznościach. Urodzili się zainteresowani możliwością wykorzystania tej techniki do wzmocnienia mięśnia zwieracza cewki moczowej. Nietrzymanie moczu jest bardzo poważnym, choć często niedocenianym problemem medycznym i społecznym. Szacuje się, że dolegliwość ta dotyka prawie 10% populacji (np. w Polsce z problemem nietrzymania moczu żyje ponad 3 miliony ludzi). U kobiet powyżej 65 roku życia liczba cierpiących z powodu nietrzymania moczu przekracza 30%. W przypadkach nietrzymania moczu na tle niedomogi zwieracza cewki moczowej jedną z koncepcji leczenia jest wstrzykiwanie różnych substancji w okolicę niewydolnego mięśnia [6]. Mają one mechanicznie wzmocnić osłabiony element dróg moczowych. Metoda ta ma ważną zaletę – jest procedurą szybką i mało inwazyjną. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat używano wielu różnych materiałów do wstrzykiwań okołocewkowych. Z każdym wiązano duże nadzieje, jednak wszystkie mają poważne wady [38,48,67]. Rozwój trasplantologii komórkowej dał nową nadzieję na rozwiązanie tego problemu. Wydaje się, że autologiczne komórki satelitowe są idealnym kandydatem na materiał do wstrzyknięć okołocewkowych. Potencjalnie mogą one zapewnić doskonałą integralność anatomiczną i nie powinny powodować silnej reakcji immunologicznej. Badania w tym kierunku są prowadzone od kilku lat na modelach zwierzęcych. Komórki satelitowe, określane też jako prekursorzy komórek mięśniowych izolowane z pobranych fragmentów mięśni szkieletowych były wstrzykiwane w okolicę bliższego końca cewki moczowej lub w ścianę pęcherza moczowego. Dowiedziono, że część komórek przeżywa w miejscu przeszczepu i fuzuje w wielojądrowe miotuby i włókna mięśniowe [7,77,80]. Postuluje się również możliwość różnicowania się wprowadzonych komórek w komórki mięśni gładkich, ponieważ wykazano w nich ekspresję α -aktyny mięśni gładkich (alpha smooth muscle actin – α -SMA) [21,78].

Jak zwykle dla klinicystów podstawowe pozostaje pytanie: czy przeszczep komórek może wydajnie wzmocnić niewydolny mięsień i tym samym przynieść oczekiwaną poprawę stanu zdrowia pacjenta? Przeprowadzono wstępne badania nad skutecznością transplantacji MPCs do zwieracza cewki moczowej na modelu mysim i szczurzym. Po doświadczalnym uszkodzeniu zwieracza przez elektrokoagulację [8,78] lub iniekcje noteksyny [77], bądź też po odnerwieniu mięśnia przez przecięcie odpowiedniej gałązki nerwu kulszowego [31] komórki satelitowe wstrzykiwano w badaną okolicę. Testowano, jakie ciśnienie płynu w pęcherzu moczowym przełamuje opór zwieracza cewki moczowej. Stwierdzono wzrost szczelności zwieracza o 41% (w stosunku do grupy kontrolnej z uszkodzonym mięśniem, do którego nie przeszczepiono komórek). Ponadto, we wstrzykniętych komórkach wykryto obecność

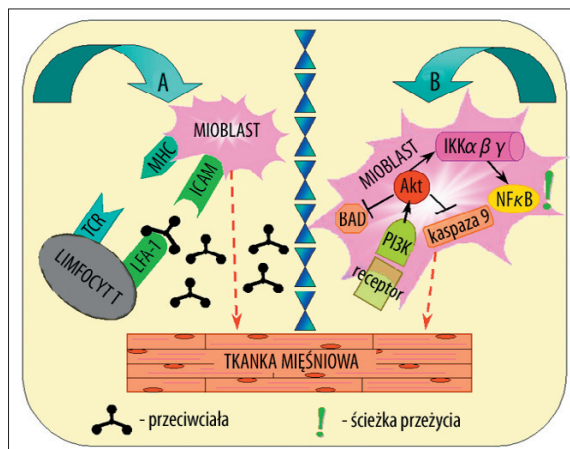
receptora acetylocholino, który występował w pobliżu zakończenia nerwowego, co sugeruje możliwość tworzenia płytek motorycznych z włóknami dawcy [78]. Oceniano również czas przeżycia wprowadzonych komórek – znane komórki były obecne w miejscu wszczepienia nawet 6 miesięcy po zabiegu [79]. Doświadczenia porównawcze wskazują, że wstrzykiwanie autologicznych komórek mięśniowych może być bardziej skuteczne w leczeniu nietrzymania moczu niż implanty okołocerkowe z bydłęcego kolagenu [82].

TRANSPLANTACJE KOMÓRKOWE I SPOSOBY POPRAWIENIA ICH SKUTECZNOŚCI

Pomimo entuzjastycznych doniesień na temat perspektyw zastosowania transplantacji komórkowych nie można zapominać o wciąż nierozwiązanych trudnościach technicznych i problemie małej wydajności metody. Najbardziej istotnym aspektem limitującym skuteczność procedur transplantologii komórkowej jest słaba przeżywalność komórek po przeszczepie. Co prawda nawet rok po transplantacji odnajdywano wszczepione komórki [2], jednak znaczna ich część (do 90%) ginie w ciągu kilku godzin lub dni po wykonaniu przeszczepu [12,20,53,83]. Prawdopodobnie główną przyczyną śmierci wstrzykniętych komórek jest reakcja zapalna biorcy [71]. Wiadomo ponadto, że na jej tle dochodzi do apoptozy i/lub nekrozy komórek, a sprzyja temu dodatkowo niedotlenienie tkanek w miejscu przeszczepu (dotyczy w szczególności transplantacji komórek do mięśnia sercowego po zawale) [83]. Główne strategie ochrony komórek przed śmiercią po transplantacji to:

- działanie przeciwzapalne,
- poszukiwanie populacji komórek, która po wstrzyknięciu wykazuje zwiększoną przeżywalność,
- zmiana właściwości wstrzykiwanych komórek za pośrednictwem hartowania lub wprowadzania modyfikacji genetycznych.

Wiadomo, że zapalenie odgrywa ważną rolę w destrukcji wstrzykniętych komórek. Ekspresja jednej z głównych cytokin prozapalnych – interleukiny 1 (IL-1) wzrasta w miejscu iniekcji w ciągu pierwszych 24 godzin po przeszczepie, czyli wtedy, gdy umieralność komórek jest największa. Podanie przeciwciał skierowanych przeciwko IL-1-beta (Ab-anty-IL-1beta) zwiększyło dwukrotnie przeżywalność wstrzykniętych komórek [70]. Podobnie, transfekowanie przeszczepianych mioblastów genem kodującym antagonistę receptora interleukiny (IL-1R) znacząco zmniejszyło odsetek komórek ginących po 48 i 120 godzinach od transplantacji [43,53]. Dotychczas jednak nie scharakteryzowano dokładnie cech procesu zapalnego rozwijającego się w odpowiedzi na przeszczep komórkowy. W mięśniach po wstrzyknięciu komórek pojawia się naciek zapalny, w którym zidentyfikowano makrofagi, neutrofile, limfocyty T, komórki NK [15]. Badacze nie są jednak zgodni co do tego, które z tych komórek i jakie mechanizmy biorące udział w reakcji zapalnej są w pierwszym rzędzie odpowiedzialne za eliminację wprowadzanych do organizmu mioblastów. Szybkość z jaką komórki są niszczone, sugeruje dominującą rolę nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, a zatem udziału makrofagów, neutrofilów i odczynu wiązania dopełniacza [65]. Jednak badania Hodgettisa i wsp. dowodzą, że inaktywacja limfocytów CD4+ i CD8+ za pomocą odpowiednich przeciwciał zwiększyła przeży-



Ryc. 2. Próby ochrony komórek przed eliminacją po transplantacji.

A – stosowanie przeciwciał anti-LFA-1 może ograniczyć interakcję między limfocytami T a wstrzykniętymi mioblastami, B – transfekowanie mioblastów aktywną postacią kinazy Akt hamuje apoptozę i promuje ścieżkę przeżycia z udziałem NF- κ B, co może zwiększyć ich przeżywalność po transferze

walność przeszczepu komórkowego [17]. Działanie limfocytów w czasie kilku godzin po transplantacji próbuje się wyjaśnić możliwością bezpośredniego oddziaływania limfocytów T z wprowadzonymi mioblastami bez udziału komórek prezentujących antygeny. Uważa się, że receptor TCR na limfocytach T może rozpoznać cząsteczki MHC na przeszczepionych komórkach. Dodatkowo, mioblasty wykazują stałą ekspresję cząsteczki ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), która jest ligandem dla LFA-1 (leukocyte function antigen – 1) obecnego na większości leukocytów, również na limfocytach. Jest zatem możliwe, że interakcje TCR/MHC i LFA-1/ICAM-1 stymulują aktywność limfocytów T bez udziału komórek prezentujących antygeny i w ten sposób przyczyniają się do wczesnego niszczenia wstrzykniętych mioblastów [65] (ryc. 2A). Dotychczas nie ma na to jednoznacznych dowodów, wydaje się jednak, że czynnik LFA-1 rzeczywiście odgrywa istotną rolę w rozwijającym się procesie zapalnym po przeszczepie. Guerette i wsp. stosując przeciwciała anti-LFA-1 obserwowali znaczące zmniejszenie liczby umierających komórek trzeciego dnia po przeszczepie [16].

Hodgettis i wsp. sugerowali z kolei, że komórki NK istotnie przyczyniają się do eliminacji przeszczepionych mioblastów, ponieważ obserwowali wzrost przeżywalności wprowadzonych komórek po blokowaniu komórek NK odpowiednimi przeciwciałami [18]. Jednak dalsze badania nie potwierdziły znaczącej roli tych komórek w odpowiedzi immunologicznej indukowanej przeszczepem komórkowym [61]. Sammels i wsp. uważają, że makrofagi i neutrofile nie wykazują istotnego wpływu na wczesną śmierć komórek po przeszczepie, jednak pogląd ten jest kontrowersyjny. Wiadomo, że jednym z podstawowych mechanizmów wykorzystywanych przez komórki żerne (neutrofile, makrofagi) do eliminacji innych komórek jest gwałtowne pobudzenie procesów oksydacyjnych i wytworzenie reaktywnych form tlenu, azotu i chloru o właściwościach cytotoksycznych i cytopatycznych. Powstające wolne rodniki działają głównie w fagolizosomie, ale mogą się z niego wydostać lub pojawić się w bezpośrednim sąsiedztwie ko-

mórki żernej w wyniku tzw. „wybuchu tlenowego” i być szkodliwe dla otoczenia komórki, ale i dla niej samej [23]. Istnieje pogląd, że zabiegi preinkubacji z antyoksydantami lub hartowanie komórek umiarkowanym w natężeniu stresem oksydacyjnym mogą ograniczyć umieralność komórek po przeszczepie. Z naszych badań przeprowadzonych na mioblastach szczurzych linii klonalnej L6 wynika, że preinkubacja z przeciwutleniaczami (askorbinianem, N-acetylocysteiną) chroni te komórki w warunkach *in vitro* przed genotoksycznymi skutkami stresu oksydacyjnego wywołanego przez RFT/RFA [47]. W analogicznych warunkach doświadczalnych katalaza zapewniała mioblastom L6 ochronę przed śmiercią indukowaną przez stres oksydacyjny, rozwijający się w następstwie cytotoksycznego oddziaływania deksametazonu na komórki [44,45,47]. Suzuki i wsp. przeprowadzili doświadczenia z przeszczepianiem mioblastów do mysiego mięśnia sercowego. Preinkubacja przeszczepianych komórek z dysmutazą ponadtlennową powodowała dwukrotne zwiększenie odsetka komórek przeżyjących po 72 godzinach od zabiegu [71]. Sugeruje to istotny udział reaktywnych form tlenu we wczesnej eliminacji wprowadzanych do organizmu komórek.

Wobec niespójności doniesień co do głównej przyczyny eliminacji przeszczepianych komórek należy mieć nadzieję, że dalsze badania nad charakterystyką reakcji zapalnej rozwijającej się w wyniku transplantacji komórek umożliwią pełniejsze zrozumienie zachodzących zjawisk z uwzględnieniem różnic pomiędzy przeszczepami autologicznymi i alogenicznymi. Inną koncepcją poprawienia przeżywalności przeszczepu komórkowego jest poszukiwanie populacji komórek o odpowiednich cechach metabolicznych i wysokim potencjale wzrostowym, które mogłyby wykazywać zwiększoną przeżywalność po przeszczepie. Pierwotna pula komórek uzyskana z mięśnia szkieletowego jest bardzo niejednorodna. Odpowiednie zmiany warunków hodowli mogą promować proliferację różnych rodzajów komórek [54]. Qu i wsp. przez wykorzystanie różnic w zdolności przylegania do podłoża opisali 6 populacji komórek pochodzenia mięśniowego. Wykazywały one różną ekspresję desminy, potencjał fuzowania w miotuby i, co niezmiernie istotne, znacząco różniła się ich przeżywalność po przeszczepie. Populacja, która najlepiej przylegała do komórki, które najwolniej przylegały do podłoża, chętnie różnicowała się w miotuby i wykazywały ekspresję desminy prawie w 75%. Co ciekawe, komórki uzyskane z izolowanych włókien mięśniowych, wykazujące ekspresję desminy w ponad 95% populacji, gwałtownie umierały po przeszczepie (utracono 96% komórek w ciągu 48 godzin po zabiegu) [53]. Również Lee i wsp. twierdzą, że najlepiej przeżywają te komórki, które najwolniej przylegają do podłoża, jednak według ich obserwacji, populacja tych komórek wykazuje bardzo ograniczoną zdolność do różnicowania *in vitro* [31].

Losy komórek po przeszczepie próbuje się też zmienić wykorzystując manipulacje genetyczne. Do genomu mioblastów wprowadza się geny, które zmieniają właściwości samych komórek lub oddziałują na otoczenie, w którym się znajdują. Istotnym czynnikiem ograniczającym efektywność transplantacji komórek do mięśnia sercowego po zawale jest niedotlenienie obszaru miokardium objętego martwicą. Teoretycznie, połączenie techniki przeszczepu komórkowego z wprowadzeniem czynników nasilających angio-

genezę mogłoby poprawić regenerację mięśnia sercowego. Przeprowadzono doświadczenia ze wstrzykiwaniem kardiomiocytów lub komórek satelitowych transfekowanych genem kodującym śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – vascular endothelial growth factor). Zaobserwowano wzrost ekspresji czynnika VEGF i znaczące zwiększenie gęstości naczyń włosowatych w obszarze blizny pozawałowej w stosunku do przeszczepu komórek niemodyfikowanych genetycznie [75,76]. Innym pomysłem na zwiększenie wydajności transplantacji komórek satelitowych do mięśnia sercowego jest umożliwienie im tworzenia ścisłych złączy z kardiomiocytami gospodarza. Dowiedziono, że komórki satelitarne wstrzyknięte do mięśnia sercowego różnicują się w włókna, które nie wykazują ekspresji białek umożliwiających wytwarzanie ścisłych złączy z resztą mięśnia sercowego [60]. Podejmowane są zatem próby transfekowania komórek satelitowych genem kodującym koneksynę 43 [68]. Okazało się jednak, że komórki satelitarne wykazujące ekspresję koneksyny 43 ginęły w czasie różnicowania w włókna mięśniowe. Zastosowanie genu kinazy kreatynowej jako promotora ekspresji genu kodującego koneksynę 43 w różnicujących się komórkach rozwiązało problem śmierci komórek w czasie różnicowania [59]. Jest jednak wątpliwe, czy obecność ścisłych złączy między komórkami dawcy i biorcy rzeczywiście uczyni przeszczep bardziej skutecznym. Scorsin i wsp. przeszczepiali do mięśnia sercowego kardiomiocyty z ekspresją i komórki satelitarne bez ekspresji koneksyny 43 i uzyskali podobną skuteczność regeneracji w obu przypadkach [62].

Przeszczepiane komórki giną również w wyniku apoptozy [83]. Próbowano zatem zwiększyć oporność komórek na działanie czynników apoptogennych. Jednym z torów sygnałowych przeżycia komórek jest kaskada obejmująca kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K) i kinazę białkową B (PKB/Akt). Transfekowanie aktywną postacią kinazy Akt czyniło komórki odpornymi na apoptogenne działanie wielu czynników, takich jak promieniowanie UV, cytokina TGF- β czy przeciwciała agoniści receptora Fas (APO/CD95). Aktywna postać kinazy Akt inaktywuje wewnątrz komórki proapoptotyczne białko BAD i kaspazę 9, a ponadto poprzez fosforylację kinazy IKK uaktywnia czynnik transkrypcyjny NF- κ B, odpowiedzialny za ekspresję genów warunkujących przeżycie komórek [10] (ryc 2B), w tym komórek satelitowych myszy linii klonalnej C2C12 [28]. W celu wykorzystania opisanych mechanizmów do zwiększenia przeżywalności transplantowanych komórek Zhang i wsp. transfekowali kardiomiocyty przed przeszczepem do mięśnia sercowego genem kodującym aktywną postać kinazy Akt. Po przeszczepie 40% mniej komórek z nadekspresją kinazy Akt ulegało apoptozie w porównaniu z układem kontrolnym komórek bez transfekcji genem *akt*. Obie populacje komórek były transfekowane genem markerem *n-lac* służącym do ich identyfikacji w miejscu wstrzyknięcia. Jednocześnie zauważono, że sam adenowirus służący jako narzędzie transfekcji zmniejsza przeżywalność infekowanych kardiomiocytów [83]. Poszukiwane są zatem również metody uodparniania przeszczepianych komórek bez konieczności stosowania terapii genowej. Jak już wcześniej wspomniano alternatywą może być np. tzw. „hartowanie” komórek (preconditioning). Jedną z koncepcji zakłada poddawanie komórek szokowi cieplnemu. Podczas inkubacji w temperaturze 42–43°C przez 30–60 min w komórkach wzrasta znacznie ekspresja białek szoku cieplne-

go. Białka te chronią komórkę przed wpływem niekorzystnych warunków np. niedoborem glukozy w środowisku czy niedotlenieniem, a także przed czynnikami apoptogennymi np. działaniem ligandu Fas (Fas-L) receptora Fas/APO/CD95, który uruchamia apoptozę zewnątrzpochodną zależną od kaspazy 8. Rzeczywiście, poddanie komórek działaniu podwyższonej temperatury przed wstrzyknięciem do mięśnia sercowego dwukrotnie zmniejszyło odsetek komórek ulegających apoptozie po przeszczepie [72].

Podsumowując, wstępne wyniki badań nad transplantacjami komórek pochodzenia mięśniowego są bardzo obiecujące. Istnieją dowody, że przeszczepy takie mogą wpływać

na poprawę funkcjonowania upośledzonych mięśni. Jednak mechanizmy molekularne, które mogą wpływać na poprawę skuteczności zabiegu nie zostały w pełni poznane. Dlatego też, konieczne są dalsze badania nad losem komórek po wstrzyknięciu i ustaleniu procedur, które mogłyby zwiększyć przeżywalność przeszczepu (m.in. zastosowanie antyoksydantów, hartowanie oksydantami). Potrzebne jest również określenie jak trwale są skutki tych zabiegów, aby ocenić czy zabieg wymaga powtórzenia, a jeśli tak to jak często i ile razy. Wydaje się jednak, że istnieje nadzieja na praktyczne wykorzystanie transplantacji komórkowych jako metody alternatywnej dla transplantacji całonarzadowych i farmakoterapii chorób mięśniowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aaronson I.A., Rames R.A., Greene W.B., Walsh L.G., Hasal U.A., Garen P.D.: Endoscopic treatment of reflux: migration of teflon to the lungs and brain. *Eur. Urol.*, 1993; 23: 394–399
- [2] Al Attar N., Carrion C., Ghostine S., Garcin I., Vilquin J.T., Hagege A.A., Menasche P.: Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res.*, 2003; 58: 142–148
- [3] Anasetti C.: Advances in the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*, 2004; 77: S79–S83
- [4] Atkins B.Z., Hueman M.T., Meuchel J.M., Cottman M.J., Hutcheson K.A., Taylor D.A.: Myogenic cell transplantation improves *in vivo* regional performance in infarcted rabbit myocardium. *J. Heart Lung Transplant.*, 1999; 18: 1173–1180
- [5] Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami C.A., Anversa P.: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 1750–1757
- [6] Benshushan A., Brzezinski A., Shoshani O., Rojansky N.: Periurethral injection for the treatment of urinary incontinence. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 1998; 53: 383–388
- [7] Chancellor M.B., Yokoyama T., Tirney S., Mattes C.E., Ozawa H., Yoshimura N., de Groat W.C., Huard J.: Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. *Neurourol. Urodyn.*, 2000; 19: 279–287
- [8] Chermansky C.J., Tarin T., Kwon D.D., Jankowski R.J., Cannon T.W., de Groat W.C., Huard J., Chancellor M.B.: Intraurethral muscle-derived cell injections increase leak point pressure in a rat model of intrinsic sphincter deficiency. *Urology*, 2004; 63: 780–785
- [9] Chiu L.M., Domagala B.M., Park J.M.: Management of opportunistic infections in solid-organ transplantation. *Prog. Transplant.*, 2004; 14: 114–129
- [10] Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E.: Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.*, 1999; 13: 2905–2927
- [11] Etzion S., Battler A., Barbash I.M., Cagnano E., Zarin P., Granot Y., Kedes L.H., Kloner R.A., Leor J.: Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2001; 33: 1321–1330
- [12] Fan Y., Maley M., Beilharz M., Grounds M.: Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve*, 1996; 19: 853–860
- [13] Ghostine S., Carrion C., Souza L.C., Richard P., Bruneval P., Vilquin J.T., Pouzet B., Schwartz K., Menasche P., Hagege A.A.: Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, 2002; 106(12 Suppl.1): 1131–1136
- [14] Goodell M.A., Jackson K.A., Majka S.M., Mi T., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K.: Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001; 938: 208–218
- [15] Guerette B., Asselin I., Vilquin J.T., Roy R., Tremblay J.P.: Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*, 1995; 18: 39–51
- [16] Guerette B., Skuk D., Celestin F., Huard C., Tardif F., Asselin I., Roy B., Goulet M., Roy R., Entman M., Tremblay J.P.: Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J. Immunol.*, 1997; 159: 2522–2531
- [17] Hodgetts S.I., Beilharz M.W., Scalzo A.A., Grounds M.D.: Why do cultured transplanted myoblasts die *in vivo*? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant.*, 2000; 9: 489–502
- [18] Hodgetts S.I., Spencer M.J., Grounds M.D.: A role for natural killer cells in the rapid death of cultured donor myoblasts after transplantation. *Transplantation*, 2003; 75: 863–871
- [19] Horl H.W., Feller A.M., Biemer E.: Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann. Plast. Surg.*, 1991; 26: 248–258
- [20] Huard J., Acsadi G., Jani A., Massie B., Karpati G.: Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum. Gene Ther.*, 1994; 5: 949–958
- [21] Huard J., Yokoyama T., Pruchnick R., Qu Z., Li Y., Lee J.Y., Somogyi G.T., de Groat W.C., Chancellor M.B.: Muscle-derived cell-mediated *ex vivo* gene therapy for urological dysfunction. *Gene Ther.*, 2002; 9: 1617–1626
- [22] Hutcheson K.A., Atkins B.Z., Hueman M.T., Hopkins M.B., Glower D.D., Taylor D.A.: Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant.*, 2000; 9: 359–368
- [23] Jakóbsiak M.: Mechanizmy zabijania drobnoustrojów przez komórki żerne. W: *Immunologia*, PWN, Warszawa, 1998, 201–206
- [24] Kageyama Y., Li X.K., Suzuki S., Suzuki H., Suzuki K., Kazui T., Harada Y.: Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats. *Ann. Thorac. Surg.*, 1998; 65: 1604–1609
- [25] Kiilholma P.J., Chancellor M.B., Makinen J., Hirsch I.H., Kleini P.J.: Complications of teflon injection for stress urinary incontinence. *Neurourol. Urodyn.*, 1993; 12: 131–137
- [26] Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S.J.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001; 105: 369–377
- [27] Kucia M., Majka M., Ratajczak M.Z.: Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych: fakt czy artefakt? *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30(Supl.21): 3–15
- [28] Kwiecińska P., Roszkiewicz B., Łokociejewska M., Orzechowski A.: Elevated expression of NF-κB and Bcl-2 proteins in C2C12 myocytes during myogenesis is affected by PD98059, LY294002 or SB203580. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 319–331
- [29] Law P.K., Goodwin T.G., Wang M.G.: Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve*, 1988; 11: 525–533
- [30] Lázic S.E., Barker R.A.: The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 2003; 12: 635–642
- [31] Lee J.Y., Cannon T.W., Pruchnick R., Fraser M.O., Huard J., Chancellor M.B.: The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.*, 2003; 14: 31–37
- [32] Leobon B., Garcin I., Menasche P., Vilquin J.T., Audinat E., Chappak S.: Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 7808–7811

- [33] Leor J., Patterson M., Quinones M.J., Kedes L.H., Kloner R.A.: Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*, 1996; 94(9 Suppl.): II332–336
- [34] Menasche P.: Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res.*, 2003; 58: 351–357
- [35] Menasche P., Hagege A.A., Scorsin M., Pouzet B., Desnos M., Duboc D., Schwartz K., Vilquin J.T., Marolleau J.P.: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, 2001; 357: 279–280
- [36] Menasche P., Hagege A.A., Vilquin J.T., Desnos M., Abergel E., Pouzet B., Bel A., Sarateanu S., Scorsin M., Schwartz K., Bruneval P., Benbunan M., Marolleau J.P., Duboc D.: Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003; 41: 1078–1083
- [37] Mendell J.R., Kissel J.T., Amato A.A., King W., Signore L., Prior T.W., Sahenk Z., Benson S., McAndrew P.E., Rice R., Nagaraja H., Stephens R., Lantry L., Morris G.E., Burghes A.H.M.: Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 333: 832–838
- [38] Meschia M., Pifarotti P., Gattei U., Crosignani P.G.: Injection therapy for the treatment of stress urinary incontinence in women. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2002; 54: 67–72
- [39] Miller R.G., Sharma K.R., Pavlath G.K., Gussoni E., Mynhier M., Lanctot A.M., Greco C.M., Steinman L., Blau H.M.: Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve*, 1997; 20: 469–478
- [40] Morandi L., Bernasconi P., Gebbia M., Mora M., Crosti F., Mantegazza R., Cornelio F.: Lack of mRNA and dystrophin expression in DMD patients three months after myoblast transfer. *Neuromuscul. Disord.*, 1995; 5: 291–295
- [41] Muller-Ehmsen J., Peterson K.L., Kedes L., Whittaker P., Dow J.S., Long T.I., Laird P.W., Kloner R.A.: Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*, 2002; 105: 1720–1726
- [42] Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., Hauschka S.D.: Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 2512–2523
- [43] Murtuza B., Suzuki K., Bou-Gharios G., Beauchamp J.R., Smolenski R.T., Partridge T.A., Yacoub M.H.: Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4216–4221
- [44] Orzechowski A., Grizard J., Jank M., Gajkowska B., Łokociejewska M., Zaron-Teperek M., Godlewski M.: Dexamethasone-mediated regulation of death and differentiation of muscle cells. Is hydrogen peroxide involved in the process? *Reprod. Nutr. Dev.*, 2002; 42: 197–216
- [45] Orzechowski A., Jank M., Gajkowska B., Sadkowski T., Godlewski M., Ostaszewski P.: Delineation of signalling pathway leading to antioxidant-dependent inhibition of dexamethasone-mediated muscle cell death. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2003; 24: 33–53
- [46] Orzechowski A., Jank M., Gajkowska B., Sadkowski T., Godlewski M.: A novel antioxidant-inhibited dexamethasone-mediated and caspase-3 independent muscle cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 1010: 205–208
- [47] Orzechowski A., Łokociejewska M., Muras P., Hocquette J.F.: Preconditioning with millimolar concentrations of vitamin C or N-acetylcysteine protects L6 muscle cells insulin-stimulated viability and DNA synthesis under oxidative stress. *Life Sci.*, 2002; 71: 1793–1808
- [48] Pannek J., Brands F.H., Senge T.: Particle migration after transurethral injection of carbon coated beads for stress urinary incontinence. *J. Urol.*, 2001; 166: 1350–1353
- [49] Partridge T.: Myoblast transplantation. *Neuromuscul. Disord.*, 2002; 12(Suppl.1): S3–S6
- [50] Partridge T.A., Grounds M., Sloper J.C.: Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature*, 1978; 273: 306–308
- [51] Partridge T.A., Morgan J.E., Coulton G.R., Hoffman E.P., Kunkel L.M.: Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 1989; 337: 176–179
- [52] Poulson R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002; 197: 441–456
- [53] Qu Z., Balkir L., van Deutekom J.C., Robbins P.D., Pruchnic R., Huard J.: Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.*, 1998; 142: 1257–1267
- [54] Rando T.A., Blau H.M.: Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J. Cell Biol.*, 1994; 125: 1275–1287
- [55] Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M., Reca R., Ratajczak J.: Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2004; 42: 139–146
- [56] Reffelmann T., Kloner R.A.: Cellular cardiomyoplasty – cardiomyocytes, skeletal myoblasts, or stem cells for regenerating myocardium and treatment of heart failure? *Cardiovasc. Res.*, 2003; 58: 358–368
- [57] Reinecke H., MacDonald G.H., Hauschka S.D., Murry C.E.: Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J. Cell Biol.*, 2000; 149: 731–740
- [58] Reinecke H., Minami E., Poppa V., Murry C.E.: Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ. Res.*, 2004; 94: e56–e60
- [59] Reinecke H., Minami E., Virag J.I., Murry C.E.: Gene transfer of connexin43 into skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.*, 2004; 15: 627–636
- [60] Reinecke H., Poppa V., Murry C.E.: Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002; 34: 241–249
- [61] Samuels L.M., Bosio E., Fragall C.T., Grounds M.D., van Rooijen N., Beilharz M.W.: Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation*, 2004; 77: 1790–1797
- [62] Scorsin M., Hagege A., Vilquin J.T., Fiszman M., Marotte F., Samuel J.L., Rappaport L., Schwartz K., Menasche P.: Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2000; 119: 1169–1175
- [63] Siminiak T., Fisz D., Jerzykowska O., Grygielska B., Kałmucki P., Kurpisz M.: Percutaneous autologous myoblast transplantation in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment – report on two cases. *Kardiol. Pol.*, 2003; 59: 492–501
- [64] Siminiak T., Kalawski R., Fisz D., Jerzykowska O., Rzezniczak J., Rozwadowska N., Kurpisz M.: Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am. Heart J.*, 2004; 148: 531–537
- [65] Smythe G.M., Hodgetts S.I., Grounds M.D.: Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol. Ther.*, 2000; 1: 304–313
- [66] Stoddart H., Donovan J., Whitley E., Sharp D., Harvey I.: Urinary incontinence in older people in the community: a neglected problem? *Br. J. Gen. Pract.*, 2001; 51: 548–552
- [67] Su T.H., Hsu C.Y., Chen J.C.: Injection therapy for stress incontinence in women. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.*, 1999; 10: 200–206
- [68] Suzuki K., Brand N.J., Allen S., Khan M.A., Farrell A.O., Murtuza B., Oakley R.E., Yacoub M.H.: Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2001; 122: 759–766
- [69] Suzuki K., Brand N.J., Smolenski R.T., Jayakumar J., Murtuza B., Yacoub M.H.: Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. *Circulation*, 2000; 102(19 Suppl.3): III359–364
- [70] Suzuki K., Murtuza B., Beauchamp J.R., Brand N.J., Barton P.J., Varela-Carver A., Fukushima S., Coppen S.R., Partridge T.A., Yacoub M.H.: Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation*, 2004; 110: II219–224
- [71] Suzuki K., Murtuza B., Beauchamp J.R., Smolenski R.T., Varela-Carver A., Fukushima S., Coppen S.R., Partridge T.A., Yacoub M.H.: Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.*, 2004; 18: 1153–1155
- [72] Suzuki K., Smolenski R.T., Jayakumar J., Murtuza B., Brand N.J., Yacoub M.H.: Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation*, 2000; 102: III216–221
- [73] Tremblay J.P., Malouin F., Roy R., Huard J., Bouchard J.P., Satoh A., Richards C.L.: Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.*, 1993; 2: 99–112
- [74] Vilquin J.T., Kinoshita I., Roy B., Goulet M., Engvall E., Tome F., Fardeau M., Tremblay J.P.: Partial laminin $\alpha 2$ chain restoration in $\alpha 2$ chain-deficient dy/dy mouse by primary muscle cell culture transplantation. *J. Cell Biol.*, 1996; 133: 185–197

- [75] Yau T.M., Fung K., Weisel R.D., Fujii T., Mickle D.A., Li R.K.: Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells. *Circulation*, 2001; 104: 1218–222
- [76] Yau T.M., Li G., Weisel R.D., Reheman A., Jia Z.Q., Mickle D.A., Li R.K.: Vascular endothelial growth factor transgene expression in cell-transplanted hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2004; 127: 1180–1187
- [77] Yiou R., Dreyfus P., Chopin D.K., Abbou C.C., Lefaucheur J.P.: Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int.*, 2002; 89: 298–302
- [78] Yiou R., Yoo J.J., Atala A.: Restoration of functional motor units in a rat model of sphincter injury by muscle precursor cell autografts. *Transplantation*, 2003; 76: 1053–1060
- [79] Yokoyama T., Huard J., Chancellor M.B.: Myoblast therapy for stress urinary incontinence and bladder dysfunction. *World J. Urol.*, 2000; 18: 56–61
- [80] Yokoyama T., Huard J., Pruchnic R., Yoshimura N., Qu Z., Cao B., de Groat W.C., Kumon H., Chancellor M.B.: Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle. *Urology*, 2001; 57: 826–831
- [81] Yokoyama T., Pruchnic R., Lee J.Y., Chuang Y.C., Jumon H., Yoshimura N., de Groat W.C., Huard J., Chancellor M.B.: Autologous primary muscle-derived cells transfer into the lower urinary tract. *Tissue Eng.*, 2001; 7: 395–404
- [82] Yokoyama T., Yoshimura N., Dhir R., Qu Z., Fraser M.O., Kumon H., de Groat W.C., Huard J., Chancellor M.B.: Persistence and survival of autologous muscle derived cells versus bovine collagen as potential treatment of stress urinary incontinence. *J Urol.*, 2001; 165: 271–276
- [83] Zhang M., Methot D., Poppa V., Fujio Y., Walsh K., Murry C.E.: Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2001; 33: 907–921
- [84] Zieliński J., Leńko J.: Wysiłkowe nietrzymanie moczu u kobiet. *Urologia*, tom II, PZWL, Warszawa, 1993; 71–75
- [85] Zimmerman S.D., Karlon W.J., Holmes J.W., Omens J.H., Covell J.W.: Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen organization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 278: H194–200