

**Załącznik 3**  
**Autoreferat w języku polskim**

Załącznik 3  
Autoreferat w języku polskim

## Autoreferat

### 1. Imię i Nazwisko.

**Małgorzata Zimowska-Wypych**

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2001 – doktor biologii; Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Cytologii; specjalizacja: biologia

Praca doktorska pt. „Zmiany aktywności kalpain w czasie regeneracji mięśni szkieletowych szczura *in vivo* oraz proliferacji i różnicowania komórek satelitowych *in vitro* pod wpływem funkcjonalnych analogów siarczanu heparanu”

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

1996 – magister biologii, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Cytologii; specjalizacja: biologia ogólna

Praca magisterska pt.: "Zmiany poziomu kalpains m i  $\mu$  w wolnych i szybkich mięśniach szkieletowych szczura podczas regeneracji"

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Moraczewski

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

od 1.10.2013	asystent w Zakładzie Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
15.12.2001-30.09.2013	adiunkt w Zakładzie Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
1.10.1997-19.11.2001	doktorant w Zakładzie Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
1.10.1996 - 1.10 1997	asystent w Zakładzie Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

***Komórkowe i molekularne podstawy różnic w regeneracji  
wolnych i szybkich mięśni szkieletowych  
– rola środowiska zewnątrzkomórkowego.***

**b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),**

1. Nowak E, Gawor M, Ciemerych MA, **Zimowska M (2018)** Silencing of gelatinase expression delays myoblast differentiation *in vitro*. Cell Biol Int 42(3):373-382
2. Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, **Zimowska M. (2017)** The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration. Cell Biol Int Jul;41(7):706-715
3. **Zimowska M**, Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, Kaczmarska K, Gladysz D, Streminska W, Ciemerych MA **(2017)** Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. Muscle Nerve 55(3):400-409
4. **Zimowska M**, Olszynski KH, Swierczyńska M, Streminska W, Ciemerych MA **(2012)** Decrease of MMP-9 activity improves Soleus muscle regeneration. Tissue Eng Part A. Jun;18(11-12):1183-92
5. **Zimowska M**, Duchesnay A, Dragun P, Oberbek A, Moraczewski J and Martelly I **(2009)** Immunoneutralization of TGF $\beta$ 1 improves skeletal muscle regeneration: effects on myoblast differentiation and glycosaminoglycan content. Int J Cell Biol vol. 2009:659372, doi:10.1155/2009/659372
6. **Zimowska M**, Brzoska E, Swierczyńska M, Streminska W and Moraczewski J **(2008)** Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration *in vivo*. Int J Dev Biol 52: 307-314

**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

## **Wstęp**

Regeneracja jest jednym z kluczowych procesów zachodzących w organizmie - każdego dnia tkanki narażone są na urazy i uszkodzenia, których naprawa jest niezbędna dla zachowania prawidłowego funkcjonowania organizmu. W porównaniu do innych tkanek, mięśnie szkieletowe ssaków charakteryzują się wysoką zdolnością do efektywnej regeneracji w odpowiedzi na różnego typu uszkodzenia.

Funkcjonalną jednostką mięśni szkieletowych jest długie, wielojądrowe, cylindryczne włókno mięśniowe. Włókna mięśniowe różnią się pod względem ich morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych właściwości. Ze względu na te różnice dokonano klasyfikacji włókien. Obecnie, najczęściej używana jest klasyfikacja w oparciu o wartość pH, w którym aktywna jest ATPaza, charakterystyczna dla poszczególnych typów włókien, dzieląc mięśnie na typ I, IIA i IIB, odpowiadający mięśniom wolno i szybko kurczącym się. Wykazują one różnice w oksydatywnej i glikolitycznej aktywności, z czym związane są różnice w ich fizjologicznych właściwościach. Także skurcz mięśni różni się pomiędzy mięśniami szybkimi i wolnymi. Czas skurczu zależy od czułości na jony  $Ca^{2+}$  aparatu kurczliwego i wydajności  $Ca^{2+}$  zmagazynowanego w retikulum endoplazmatycznym. Trzecim czynnikiem wpływającym na efektywność skurczu jest wydajność aparatu miozynowego, który zbudowany jest z różnych izoform białek w różnych mięśniach (Charge and Rudnicki, 2004, Karalaki et al., 2009, Moyer and Wagner, 2011).

Dojrzałe mięśnie są mozaiką szybko- i wolnokurczących się włókien. Mięśnie wolne, odpowiedzialne za zachowanie postawy, zawierają także włókna szybko kurczące się, podczas gdy mięśnie szybkie, wyspecjalizowane w ruchu, zawierają również niewielką liczbę wolnokurczących się włókien (Schiaffino, 2010, Schiaffino and Reggiani, 2011, Westerblad et al., 2010). Ze względu na kompozycję włókien wchodzących w ich skład, mięsień prostujący Extensor Digitorum Longus – EDL (95% szybkich włókien) i Soleus (85-100% wolnych włókien) wykorzystywane są w badaniach jako modele szybkich i wolnych mięśni (Bassaglia and Gautron, 1995).

Regeneracja mięśni szkieletowych może być indukowana na wiele sposobów np. poprzez odnerwienie, lokalne uszkodzenia (nacięcie, miażdżenie, przeszczep fragmentu mięśnia, zamrażanie, ogrzewanie) czy nastrzykiwanie toksynami. Jednak, niezależnie od typu uszkodzenia, naprawa tkanki mięśniowej zachodzi w dwóch, nakładających się fazach: miolizy i rekonstrukcji. Podczas pierwszej z nich usuwane są uszkodzone włókna mięśniowe. Następnie rozpoczyna się etap regeneracji. Aktywacji ulegają, zlokalizowane pomiędzy błoną podstawną a błoną cytoplazmatyczną włókien mięśniowe komórki macierzyste, tzw. komórki satelitowe. W odpowiedzi na bodźce związane z uszkodzeniem, komórki te intensywnie proliferują, następnie

łączą w miotuby, które dojrzewając tworzą włókna mięśniowe przywracające prawidłową architekturę i funkcję mięśni. Różnicowanie komórek satelitowych kontrolowane jest przez sekwencyjnie syntetyzowane mięśniowe czynniki transkrypcyjne należące do rodziny MRF: MyoD, Myf 5, MRF4, i miogeninę. Co istotne, zdarzenia towarzyszące regeneracji mięśni szkieletowych są również kontrolowane przez czynniki wzrostu i cytokiny, syntetyzowane nie tylko przez mięśniowe komórki prekursorowe czy włókna mięśniowe, ale również przez napływające do miejsca uszkodzenia komórki stanu zapalnego czy fibroblasty. Rekonstrukcja

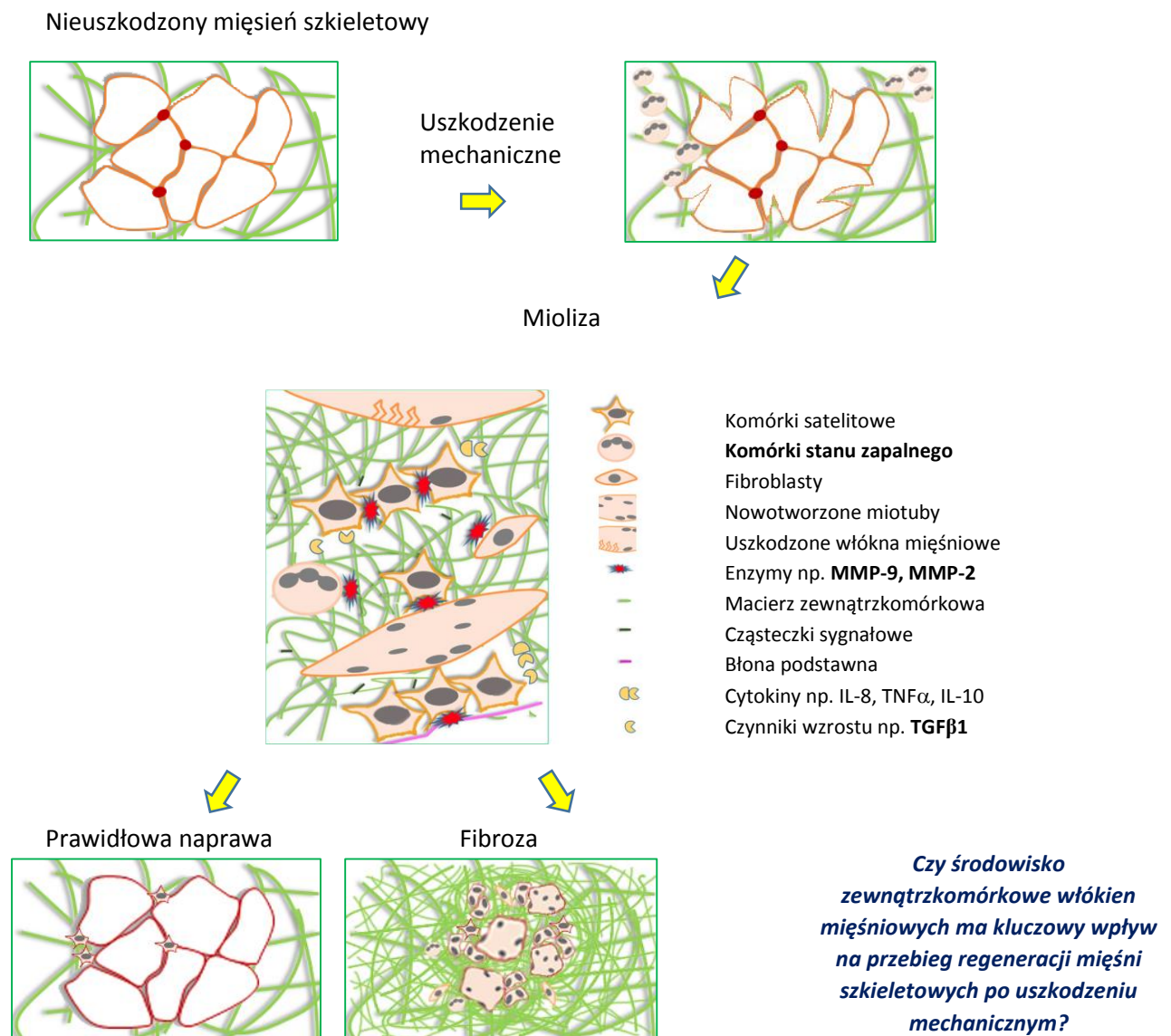


Fig.1 Naprawa mięśni szkieletowych - regeneracja vs. fibroza  
Uszkodzenie mechaniczne powoduje przerwanie integralności włókien mięśniowych. Tworzenie tymczasowej blizny jest częścią prawidłowej odpowiedzi na uszkodzenie, a odpowiednia depozycja i organizacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej jest niezbędna dla utrzymania integralności mięśnia, chroniąc go przed rozerwaniem. Stanowi także przestrzenną wskazówkę dla migrujących do miejsca uszkodzenia komórek stanu zapalnego: neutrofilii i makrofagów. Komórki satelitowe, fibroblasty, komórki stanu zapalnego i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej tworzą w uszkodzonej tkance środowisko, które przyczynia się do udanej naprawy mięśni, albo, alternatywnie, do rozwoju fibrozy.

mięśnia jest dodatkowo limitowana przez ponowne unaczynienie i unerwienie. Bez odtworzonego unaczynienia i unerwienia regenerujące mięśnie nie są zdolne do efektywnej rekonstrukcji (Dumont et al., 2015, Fu et al., 2015, Karalaki et al., 2009, Motohashi and Asakura, 2014, Murphy et al., 2011). Jeśli naprawa tkanki przebiega prawidłowo, struktura uszkodzonego mięśnia zostanie odbudowana przywracając jego funkcjonowanie. Natomiast zaburzenia na każdym z etapów tego procesu może skutkować nieprawidłową regeneracją objawiającą się degeneracją włókien mięśniowych, wysokim poziomem stanu zapalnego i nadmierną akumulacją składników macierzy zewnątrzkomórkowej, czyli rozwojem fibrozy [Fig.1].

Fibroza (włóknienie) jest najlepiej poznaną konsekwencją nieprawidłowej naprawy mięśni szkieletowych. Nadmierna akumulacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej, zakłócająca strukturę i funkcjonowanie mięśni, towarzyszy wielu stanom patologicznym, np. dystrofiom mięśniowym czy stanom zapalnym mięśni (Abdel-Salam et al., 2009, Alameddine and Morgan, 2016, Brandan and Gutierrez, 2013, Caceres et al., 2000, Fadic et al., 2006, MacDonald and Cohn, 2012, Zanotti et al., 2005, Zhu et al., 2007). Dla przebiegu tych chorób charakterystyczny jest powtarzający się cykl degeneracji i regeneracji włókien mięśniowych, w konsekwencji którego naprawa tkanki nie jest w stanie doprowadzić do zastąpienia uszkodzonych włókien nowymi. Co ciekawe, włóknienie zachodzi w zmienionych chorobowo mięśniach pomimo obecności funkcjonalnych komórek satelitowych (Laumonier and Menetrey, 2016, Moyer and Wagner, 2011, Wynn, 2008).

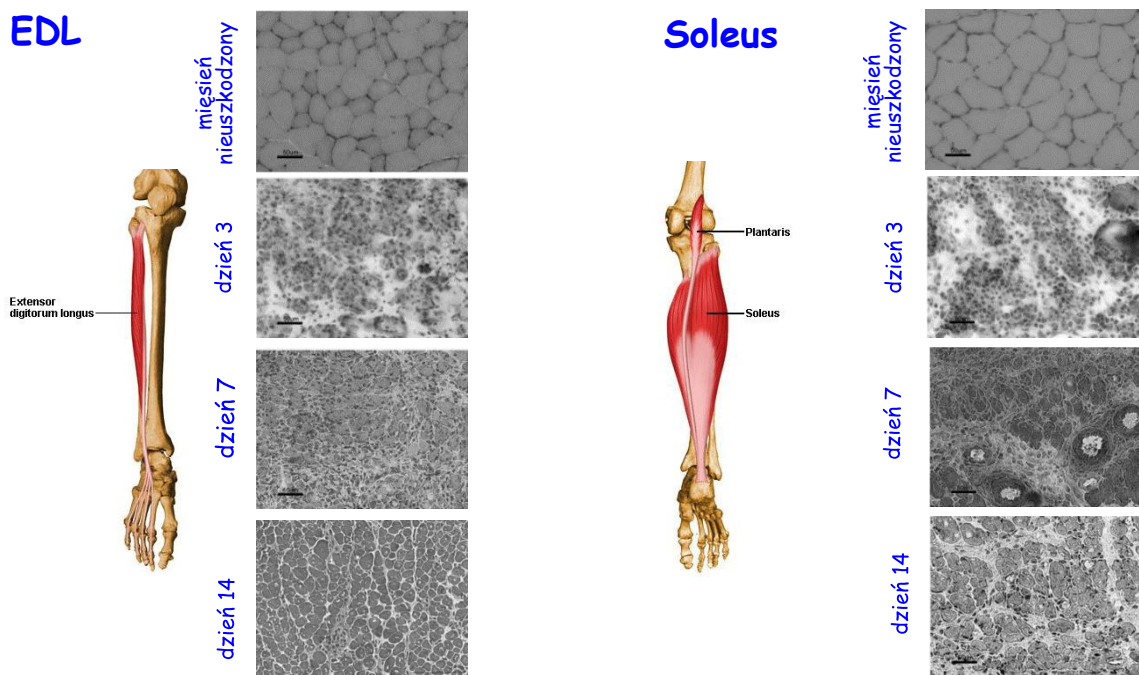


Fig.2 Morfologia nieuszkodzonych oraz regenerujących w 3, 7 i 14 dni po uszkodzeniu mechanicznym mięśni szybkich (EDL) i wolnych (Soleus).

Przebieg i efektywność naprawy mięśni szkieletowych związane są z rodzajem włókien budujących mięsień. U szczura, w mięśniach miażdżonych na całej ich długości, mioliza, która obejmuje cały mięsień, zachodzi do 3 dnia po uszkodzeniu, a następnie rozpoczyna się regeneracja. W przypadku mechanicznie uszkodzonego mięśnia szybkiego EDL naprawa tkanki przebiega bez zakłóceń, a mięsień wykazuje prawie normalną strukturę już ok. 14 dnia po uszkodzeniu. Natomiast regenerujący mięsień wolny Soleus ulega w znacznym stopniu degeneracji i włóknieniu [Fig.2]. W efekcie jego funkcjonowanie jest poważnie zaburzone (Bassaglia and Gautron, 1995).

Badania, których wyniki stanowią podstawę mojego osiągnięcia habilitacyjnego miały na celu określenie podstawy różnic w przebiegu procesu regeneracji wolnych i szybkich mięśni szkieletowych. Postawiłam hipotezę roboczą, zgodnie z którą czynnikiem determinującym naprawę tkanki mięśniowej może być środowisko zewnątrzkomórkowe, a różnice w przebiegu procesu obserwowane pomiędzy mięśniami wolnymi i szybkimi odzwierciedlają zmiany zachodzące w środowisku włókien mięśniowych zarówno na poziomie komórkowym (np. rozwój i wyciszenie stanu zapalnego) jak i molekularnym (np. zmiany w poziomie czynników odpowiedzialnych za przekształcenie środowiska zewnątrzkomórkowego).

### ***Określenie wpływu rozwoju i wyciszenia odpowiedzi zapalnej na proces regeneracji wolnych i szybkich mięśni szkieletowych***

- [Zimowska M](#), Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, Kaczmarska K, Gładysz D, Streminska W, Ciemerych MA (2017) Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. *Muscle Nerve* 55(3):400-409

Rozwój stanu zapalnego, a następnie jego skuteczne wyciszenie to, obok aktywacji komórek satelitowych i różnicowania powstałych z nich mioblastów, jeden z ważniejszych procesów wpływających na przebieg regeneracji mięśni szkieletowych. Bez obecności komórek stanu zapalnego, usuwających uszkodzone włókna oraz wydzielających sekwencyjnie szereg czynników wzrostu czy cytokin kontrolujących naprawę tkanki, odbudowa tkanki mogłaby być znacznie upośledzona, lub wręcz niemożliwa (Arnold et al., 2007, Butterfield et al., 2006, Saclier et al., 2013, Smith et al., 2008). W pierwszym etapie moich badań skupiłam się zatem na określeniu różnic w przebiegu stanu zapalnego podczas regeneracji obu rodzajów mięśni.



Uszkodzeniu mięśni szkieletowych towarzyszy wzrost poziomu cytokin prozapalnych, np. TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , które stymulują komórki śródbłonna do ekspresji cząsteczek adhezyjnych E-selektyny i P-selektyny oraz IL-6 i IL-8. Obecność tych czynników z jednej strony przyczynia się do napływu neutrofilów, które jako pierwsze komórki stanu zapalnego pojawiają się w miejscu uszkodzenia fagocytując szczątki uszkodzonej tkanki, z drugiej promuje ich adhezję. Neutrofile usuwają pozostałości uszkodzonych lub martwych komórek i włókien mięśniowych. Wydzielają również czynniki będące chemoatraktantami dla pojawiających się w późniejszym okresie komórek stanu zapalnego niezbędnych do prawidłowego przebiegu regeneracji – makrofagów (Butterfield et al., 2006, Cote et al., 2008, Peterson et al., 2006, Pizza et al., 2005, Teixeira et al., 2005). Makrofagi obecne w uszkodzonych mięśniach można podzielić na co najmniej dwie populacje: makrofagi M1 (tzw. makrofagi prozapalne) odpowiedzialne za usuwanie uszkodzonych lub martwych komórek i włókien mięśniowych oraz działające na późniejszych etapach rekonstrukcji mięśni makrofagi M2, stymulujące komórki satelitowe do podziałów. Makrofagi M1 ulegają aktywacji m.in. pod wpływem TNF- $\alpha$  syntetyzowanego przez neutrofile, podczas gdy populacja M2 aktywowana jest na późniejszym etapie przez m.in. IL-10. Sekwencyjnemu wzrostowi liczby makrofagów towarzyszy spadek liczby neutrofilów (Arnold et al., 2007, Chazaud, 2014, Deng et al., 2012, Kharraz et al., 2013, Novak et al., 2014, Saclier et al., 2013).

Moje wieloletnie obserwacje mięśni szkieletowych regenerujących po uszkodzeniu mechanicznym wskazywały, że w mięśniach z przewagą włókien wolnych nieprawidłowej regeneracji tkanki towarzyszy przedłużona obecność komórek stanu zapalnego. Postawiłam więc hipotezę, zgodnie z którą przebieg odpowiedzi immunologicznej jest inny w mięśniach szybkich, regenerujących efektywnie, w porównaniu do charakteryzujących się rozwojem fibrozy mięśniach wolnych.

Materiałem do doświadczeń mających na celu weryfikację tej hipotezy były regenerujące mięśnie Soleus (mięśnie wolne) i EDL (mięśnie szybkie) dorosłych samców szczurów. Regeneracja indukowana była poprzez zmiżdżenie mięśni na całej ich długości, prowadząc do całkowitej degeneracji, a następnie naprawy uszkodzonej tkanki. Pozwoliło to na morfologiczne i ilościowe badania biochemiczne regenerującego mięśnia w 1 i 3 dniu po uszkodzeniu kiedy zachodziła mioliza oraz w 7 i 14 dniu, kiedy trwała rekonstrukcja tkanki.

Wyniki badań wykazały, że po uszkodzeniu nieprawidłowo regenerujących mięśni wolnych stan zapalny utrzymywał się znacznie dłużej i był bardziej nasilony niż w prawidłowo regenerujących mięśniach szybkich. Jako pierwsze w zniszczonej tkance pojawiały się neutrofile. Po nich do miejsca uszkodzenia migrowały makrofagi. W obu typach mięśni najwyższa liczba neutrofilów obserwowana była w 1 dniu po uszkodzeniu, a ich poziom spadał w kolejnych dniach

regeneracji. Po raz pierwszy wykazałam, że we włókniejącym mięśniu Soleus ponowny wzrost poziomu neutrofilii następował w 14 dniu po uszkodzeniu. Wzrost ten nie był obserwowany w prawidłowo regenerującym mięśniu EDL. Wykazałam również, że udział makrofagów M2, związanych z aktywacją komórek satelitowych, był inny w obu typach mięśni. Regeneracji mięśni EDL towarzyszył niski poziom liczby makrofagów M2 na etapie miolizy i jego gwałtowny wzrost na początku etapu rekonstrukcji (dzień 5). W mięśniach Soleus obserwowałam natomiast stopniowy wzrost liczby makrofagów M2, począwszy od 1 dnia po uszkodzeniu, osiągający maksimum w dniu 5. Natomiast obecność makrofagów M1 związana była zarówno z fazą miolizy jak i rozpoczęciem etapu rekonstrukcji, a ich profil był podobny w mięśniach wolnych i szybkich. Zmianom w profilu komórek stanu zapalnego towarzyszyły różnice w poziomie czynników takich jak IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 zaangażowanych w aktywację czy migrację badanych populacji komórek do miejsca uszkodzenia.

Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły zatem na określenie różnic w rozwoju stanu zapalnego towarzyszącego regeneracji mięśni wolnych i szybkich. Po raz pierwszy wykazałam, że zarówno przedłużona obecność komórek stanu zapalnego jak i różnice w sekwencji pojawiania się poszczególnych populacji komórek obserwowane w mięśniach wolnych mogą być przyczyną zaburzeń w naprawie tej tkanki. Zatem początkowo korzystne działanie komórek stanu zapalnego, np. usuwanie zniszczonej tkanki, wydzielanie czynników promujących proliferację mioblastów i syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej, synteza enzymów przekształcających środowisko zewnątrzkomórkowe włókien mięśniowych, w późniejszych etapach regeneracji staje się szkodliwe. Określenie możliwości modyfikacji przebiegu stanu zapalnego nie tylko umożliwiłoby zrozumienie różnic w regeneracji, ale także mogłoby stworzyć szansę na opracowanie terapii ograniczającej napływ komórek stanu zapalnego do uszkodzonego mięśnia i poprawę regeneracji, szczególnie w przypadku mięśni wolnych.

W regeneracji mięśni szkieletowych kluczową rolę dla migracji komórek i odbudowy środowiska zewnątrzkomórkowego nowopowstających włókien mięśniowych odgrywa reorganizacja macierzy zewnątrzkomórkowej. Głównymi składnikami macierzy w mięśniach szkieletowych są laminina, tenascyna, fibronektyna, kolageny I, III i IV oraz siarczan dermatanu i siarczan heparanu. Składniki te nie pełnią jedynie funkcji strukturalnej, ale wpływają również na adhezję, migrację i fuzję mioblastów. Synteza składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ich organizacja przestrzenna jest precyzyjnie regulowana na kolejnych etapach regeneracji mięśni (Brzoska et al., 2011, Kaariainen et al., 2000, Karalaki et al., 2009). Prawidłowe przekształcenie środowiska zewnątrzkomórkowego nowo formujących się włókien mięśniowych

wyduje się jednym z bardziej istotnych warunków decydujących o dalszych losach tkanki. Choć początkowo pomocne, odkładanie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej może stać się szkodliwe dla funkcjonowania regenerującej tkanki, jeśli jest kontynuowane bez kontroli, powodując istotne przekształcenia błony podstawnej i tworzenie tkanki łącznej otaczającej włókna (Charge and Rudnicki, 2004, Kaariainen et al., 2000, Mahdy, 2018, Moyer and Wagner, 2011). Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie różnic w przebiegu regeneracji mięśni regenerujących prawidłowo i tych podlegających zwłóknieniu. Niestety, molekularne mechanizmy ich naprawy nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane. Wydaje się jednak, że w mięśniach szkieletowych w procesie naprawy tkanki po uszkodzeniu kluczową rolę pełnią enzymy zaangażowane w degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej – metaloproteiny: MMP-9 i MMP-2 oraz wpływający na kompozycję macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniach - transformujący czynnik wzrostu typu beta 1 (TGFβ1).

#### ***Określenie wpływu TGFβ1 na regenerację w wolnych i szybkich mięśniach szkieletowych***

- [Zimowska M, Duchesnay A, Dragun P, Oberbek A, Moraczewski J and Martelly I \(2009\)](#) Immunoneutralization of TGFβ1 improves skeletal muscle regeneration: effects on myoblast differentiation and glycosaminoglycan content. *International Journal of Cell Biology*. 2009;2009:659372. doi: 10.1155/2009/659372.
- [Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M \(2017\)](#) The role of TGF-β1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int* ;41(7):706-715 (praca przeglądowa).

Cytokiny z rodziny TGFβ (Transforming Growth Factor β) kontrolują szerokie spektrum zdarzeń. Są one regulatorami proliferacji, różnicowania, rozwoju zarodkowego i morfogenezy, uczestnicząc także w rozwoju wielu stanów patologicznych (Huang and Huang, 2005, Kubiczkova et al., 2012, Massague, 2012, Verrecchia and Mauviel, 2007). W tkankach ssaków opisano prawie 40 cząsteczek zaliczanych do rodziny czynników wzrostu TGFβ. Należą do nich: trzy izoformy transformującego czynnika wzrostu β: TGFβ-1, TGFβ-2 i TGFβ-3, będące prototypami całej rodziny, ponadto aktywiny, inhibiny, nodal, miostatyna, BMP i inne. Ze względu na różnice w ich budowie oraz w procesach, w które są zaangażowane, czynniki wzrostu z rodziny TGFβ zostały podzielone na kilka grup, wyróżnionych w obrębie dwóch podstawowych podrodzin: TGFβ /aktywiny oraz BMP/GDF (Bone morphogenetic protein/Growth and differentiation factor) .

Białka z rodziny TGFβ są syntetyzowane jako cząsteczki prekursorowe, które w aparacie Golgiego poddawane są działaniu endopeptydaz (np. furyny). Enzymy te rozcinają cząsteczkę prekursorową na dojrzały TGFβ i resztę aminoterminalną nazwaną LAP (latency-associated

peptide). LAP pozostaje jednak niekowalencyjnie przyłączona do TGF $\beta$ , tworząc kompleks, którego stabilność jest znacznie wyższa niż aktywnego TGF $\beta$ . Zapobiega to wiązaniu TGF $\beta$  do jego receptora. Wewnątrz aparatu Golgiego LAP dodatkowo kowalentnie oddziałuje z LTBP (latent TGF $\beta$  binding protein) tworząc duży, nieaktywny kompleks. Po aktywacji TGF $\beta$ , najczęściej spotykanymi formami czynnika wzrostu biorącymi udział w ścieżkach przekazywania sygnału, są homodimery takie jak TGF $\beta$  1 czy TGF $\beta$  2, choć zidentyfikowano także heterodimery np. TGF $\beta$  1.2 czy TGF $\beta$  2.3 (Hinck, 2012, Hinck and O'Connor-McCourt, 2011, Weiss and Attisano, 2013).

Czynniki z rodziny TGF $\beta$  przekazują sygnał przez heterodimerowy kompleks składający się z dwóch receptorów typu II i dwóch receptorów typu I o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. Przyjmuje się, że kluczowa ścieżka sygnalizacyjna rodziny czynników wzrostu TGF $\beta$ , prowadzi od kinazy receptora typu drugiego (typ II), poprzez kinazę receptora typu pierwszego (typ I), do białek efektorowych, które następnie przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie wpływają na transkrypcję genów docelowych (Blobe et al., 2001, Chaikuad and Bullock, 2016, Heldin and Moustakas, 2016, Hinck, 2012, Hinck and O'Connor-McCourt, 2011, Shi and Massague, 2003). Najlepiej poznanymi efektorami sygnalizacji TGF $\beta$  są białka Smad. Przedstawiciele rodziny TGF $\beta$  uczestniczą także w przekazywaniu sygnałów poprzez alternatywne ścieżki sygnalizacyjne. W nazwanych niezależnymi od Smad ścieżkami przekazywania sygnałów efektorami w odpowiedzi na sygnał TGF $\beta$  stają się np. kinaza Ras, PI 3-kinaza czy białka RhoA (Chaikuad and Bullock, 2016, Hata and Chen, 2016, Heldin and Moustakas, 2016, Luo, 2017, Macias et al., 2015, Moustakas and Heldin, 2005, Zhang, 2017). Sygnalizacja TGF $\beta$  jest także modyfikowana przez cały szereg cząsteczek oddziałujących bezpośrednio z receptorami typu I lub typu II. Należą do nich m.in. FKBP12 (FK506-binding protein 12), BAMBI (BMP and aktivin membrane bound inhibitor), czy BRAM1 (BMP receptor associated molecule 1), których specyficzne wiązanie z receptorem typu I blokuje przekazywanie sygnałów (Hata and Chen, 2016, Hinck, 2012, Hinck and O'Connor-McCourt, 2011, Kurozumi et al., 1998, Onichtchouk et al., 1999, Shi and Massague, 2003, Wang and Donahoe, 2004, Weiss and Attisano, 2013).

Wiele białek macierzy zewnątrzkomórkowej posiada zdolność wiązania i modyfikowania aktywności czynników wzrostu np. wiązanie przez fibronektynę aktywuje TGF $\beta$ . Także proteoglikany związane z powierzchnią komórki, takie jak np. dekoryna czy biglikan zdolne są do wiązania w środowisku zewnątrzkomórkowym przedstawicieli rodziny TGF $\beta$ , modyfikując ich zdolność do przekazywania sygnału. Z tego względu nazwane zostały receptorami typu III (T $\beta$ RIII). Co ciekawe, modyfikacje w podjednostkach glikozoaminoglikanu proteoglikanów takich jak np. siarczan heparanu, siarczan dermatanu czy siarczan chondroityny wpływają na poziom wiązania

TGF $\beta$  do receptora. Wydaje się, że spośród glikozoaminoglikanów obecnych w środowisku zewnątrzkomórkowym włókien mięśniowych szczególną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu mięśni szkieletowych odgrywa siarczan heparanu (Blobe et al., 2001, Brandan and Gutierrez, 2013, Caceres et al., 2000, Fadic et al., 2006, Zanotti et al., 2005, Zhu et al., 2007).

W mięśniach szkieletowych TGF $\beta$ 1 został zidentyfikowany jako czynnik modyfikujący kompozycję macierzy zewnątrzkomórkowej, negatywnie regulujący proliferację i różnicowanie mioblastów, czy hamujący rozwój motoneuronów. Wykazano również, że wysoka ekspresja TGF $\beta$ 1 związana jest z rozwojem fibrozy, towarzyszącym wielu stanom patologicznym np. w dystrofii mięśniowej Duchenne'a (Abrigo et al., 2018, Cencetti et al., 2010, Kim and Lee, 2017, MacDonald and Cohn, 2012, Massague et al., 1986, Noirez et al., 2006, Sartori et al., 2014). Ponieważ nieprawidłowej naprawie tkanki mięśniowej i rozwojowi fibrozy w mięśniach dystroficznych towarzyszy wysoki poziom ekspresji TGF $\beta$ 1, postawiłam hipotezę, zgodnie z którą różnice w efektywności regeneracji widoczne pomiędzy mięśniami z przewagą włókien wolnych lub szybkich mogą wynikać z różnic w poziomie TGF $\beta$ 1 lub/i jego receptora (T $\beta$ RI).

Badania prowadzone były we współpracy z Laboratorium CRRET (Laboratoire de recherche sur la Croissance cellulaire, la Reparation et la Regeneration Tissulaires), Faculte de Sciences et Technologie, Universite Paris XII (Francja). Materiałem do doświadczeń były regenerujące mięśnie Soleus i EDL dorosłych samców szczurów. W pierwszym etapie określałam poziom białka TGF $\beta$ 1 oraz jego receptora T $\beta$ RI w czasie regeneracji mięśni EDL i Soleus *in vivo* oraz podczas różnicowania wyizolowanych z nich mioblastów *in vitro*. Przeprowadziłam także oznaczenie zawartości glikozaminoglikanów (GAG) jako czynników modyfikujących wiązanie TGF $\beta$ 1 w macierzy zewnątrzkomórkowej i jego funkcjonowanie. Uzyskane wyniki po raz pierwszy wskazują, że regeneracji mięśni wolnych towarzyszy podwyższony poziom TGF $\beta$ 1 w porównaniu do mięśni szybkich. Wysokiemu poziomowi TGF $\beta$ 1 obserwowanemu po uszkodzeniu w mięśniach wolnych towarzyszyło masywne włóknienie tkanki oraz zmiany zawartości glikozoaminoglikanów w porównaniu do mięśni szybkich. Co ciekawe, nie zaobserwowałam znaczących różnic poziomu TGF $\beta$ 1 podczas różnicowania mioblastów wyizolowanych z mięśni EDL i Soleus. Jako że co najmniej część badanych glikozaminoglikanów obserwowanych w mięśniach jest wydzielana przez zaktywowane komórki satelitowe określiłam również poziom glikozoaminoglikanów w czasie różnicowania mioblastów *in vitro*. Uzyskane wyniki wykazały, że maksimum syntezy glikozoaminoglikanów przypadało na okres najwyższego obserwowanego poziomu TGF $\beta$ 1 w obu typach hodowli. Wydaje się zatem, że glikozoaminoglikany mogą uczestniczyć w kontroli sygnalizacji TGF $\beta$ 1 w czasie różnicowania mioblastów.

Jako że TGF $\beta$ 1 wydaje się być kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój fibrozy w mięśniach szkieletowych zablokowanie jego działania lub obniżenie poziomu w tkance

mogłoby wpłynąć na poprawę regeneracji, szczególnie w przypadku mięśni wolnych. Dlatego celem kolejnego etapu prowadzonych przeze mnie badań stało się określenie wpływu neutralizacji działania TGFβ1 na regenerację mięśni szkieletowych.

Analizom poddałam regenerujące mięśnie Soleus i EDL dorosłych samców szczurów. Działanie TGFβ1 hamowane było poprzez nastrzykiwanie uszkodzonych mięśni roztworem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko TGFβ1 lub jego receptorowi typu I (TβRI). Przeprowadziłam również doświadczenia *in vitro*, hamując aktywność TGFβ1 w czasie różnicowania wyizolowanych z obu mięśni komórek satelitowych. Uzyskane wyniki wykazały, że neutralizacja TGFβ1 przyczynia się do poprawy regeneracji uszkodzonych mięśni. Było to szczególnie wyraźne w przypadku mięśni wolnych (Soleus). Po zahamowaniu działania TGFβ1 naprawa tkanki przebiegała prawidłowo, a regenerujące mięśnie charakteryzowały się wysoką liczebnością nowopowstałych włókien mięśniowych o centralnie zlokalizowanych jądrach komórkowych. Nastrzykiwanie regenerujących mięśni przeciwciałami przeciwko TGFβ1 w sposób w znacząco hamowało również rozwój fibrozy. Natomiast doświadczenia *in vitro* wykazały, że zablokowanie działania TGFβ1 lub jego receptora TβRI przyspieszało proliferację i różnicowanie mioblastów. Towarzyszył temu podwyższony poziom syntetyzowanych przez mioblasty glikozaminoglikanów i, co istotne, zmiana ich składu tzn. wzrost poziomu siarczanu heparanu w stosunku do siarczanu chondroityny. Jako że aktywność TGFβ1 może być negatywna regulowane przez siarczan heparanu, wzrost poziomu tego glikozaminoglikanu wpływał na zahamowanie działania badanego czynnika wzrostu. Jednak, co zaskakujące, działanie przeciwciał zmniejszało całkowitą ilość glikozaminoglikanów w regenerujących mięśniach. Zatem wydaje się, że udział mioblastów w produkcji tych związków może jedynie w niewielkim stopniu przyczyniać się do przekształcenia środowiska komórkowego regenerujących mięśni, a komórkami odpowiedzialnymi za ten proces mogą być komórki stanu zapalnego, fibroblasty, czy komórki śródbłonna, obecne w uszkodzonej tkance.

Uzyskane wyniki wskazują, że kontrola aktywności TGFβ1 jest niezwykle istotnym czynnikiem wpływającym na regenerację uszkodzonego mięśnia. Wydaje się, że szczególnie w nieprawidłowo regenerujących mięśniach wolnych, wysoki poziom TGFβ1 przyczynia się do zaburzenia procesu naprawy tkanki, a zablokowanie jego działania hamuje rozwój fibrozy i poprawia regenerację.

Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły po raz pierwszy na określenie różnic w poziomie TGFβ1 pomiędzy regenerującymi po uszkodzeniu mechanicznym mięśniami z przewagą włókien wolnych i szybkich. Wykazałam również, że utrzymanie równowagi pomiędzy TGFβ1 a glikozaminoglikanami obecnymi w środowisku zewnątrzkomórkowym włókien

mięśniowych może być kluczowe dla przebiegu regeneracji, stanowiąc element mechanizmu kontrolującego ten proces.

### **Udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9 i MMP-2 w regeneracji mięśni szkieletowych**

- [Zimowska M, Brzoska E, Swierczyńska M, Stremińska W and Moraczewski J](#) Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration *in vivo* (2008) *Int J Dev Biol* 52: 307-314
- [Zimowska M, Olszynski KH, Swierczyńska M, Stremińska W, Ciemerych MA](#) (2012) Decrease of MMP-9 activity improves Soleus muscle regeneration *Tissue Eng Part A*. Jun;18(11-12):1183-92
- Nowak E, Gawor M, Ciemerych M A, [Zimowska M](#) (2018) Silencing of gelatinase expression delays myoblast differentiation *in vitro* *Cell Biol Int* 42(3):373-382

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (z ang. Matrix Metalloproteinase, MMP) zaliczane są do dużej rodziny endopeptydaz, które do swej aktywności wymagają związania jonów cynku. Początkowo MMP opisywane były jako enzymy zdolne do proteolizy kolagenu. Obecnie znanych jest wiele innych substratów MMP, a ze względu na podobieństwa ewolucyjne i aktywność substratową enzymy te podzielono na kilka grup. Wyróżniamy wśród nich kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), żelatynazy (MMP-2, MMP-9), stromielizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrylizyny (MMP-7, MMP-26), metaloproteinazy błonowe (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25) oraz inne (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28) (Apte and Parks, 2015, Brinckerhoff and Matrisian, 2002, Klein and Bischoff, 2011, Visse and Nagase, 2003).

Tradycyjnie, enzymy z rodziny MMP opisuje się jako endopeptydazy degradujące strukturalne komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, tworząc przez to przestrzeń dla funkcjonowania i migracji komórek. Zakres działania tych enzymów jest jednak znacznie szerszy. Poprzez proteolizę elementów strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej przyczyniają się do powstania cząsteczek sygnałowych, np. degradacja jednego z łańcuchów kolagenu IV przez MMP-9 prowadzi do powstania peptydu, który poprzez wiązanie z integryną  $\alpha\beta3$  działa hamująco na ponowne unaczynienie tkanki. MMP mogą także wpływać na zahamowanie lub zmianę działania aktywnych cząsteczek sygnałowych w macierzy zewnątrzkomórkowej, np. żelatynaza MMP-2 rozcinając SDF-1 powoduje jego inaktywację. MMP zdolne są również do

aktywacji nieaktywnych czynników wzrostu i cytokin, np. MMP-2 i MMP-9, poprzez odcięcie fragmentu LAP uwalniają TGF $\beta$  z, obecnego w macierzy zewnątrzkomórkowej, nieaktywnego kompleksu. MMP pośredniczą także w interakcjach między komórkami, a także pomiędzy komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową. Poprzez degradację białek, takich jak np. E-kadheryna czy CD44, przyczyniają się do modyfikacji zdolności migracyjnych komórek (Klein and Bischoff, 2011, Mott and Werb, 2004, Page-McCaw et al., 2007).

W przekształcenie mięśni szkieletowych towarzyszące regeneracji lub wzrostowi, zaangażowanych może być szereg metaloproteinaz takich jak MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13, MMP-14 i MMP-16, należących odpowiednio do kolagenaz, MMP błonowych oraz stromelizyn. Jednak enzymami pełniącymi kluczową rolę w przekształceniu środowiska zewnątrzkomórkowego włókien mięśniowych są, należące do żelatynaz, MMP-9 i MMP-2 (Alameddine, 2012, Alameddine and Morgan, 2016, Carmeli et al., 2004, Chen and Li, 2009). W mięśniach szkieletowych enzymy te pełnią funkcje regulatorowe w trakcie wzrostu i rozwoju, a ich ekspresja zmienia się również w trakcie regeneracji, odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu struktury macierzy zewnątrzkomórkowej włókien mięśniowych. Do syntezy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej zdolne są mioblasty oraz włókna mięśniowe, a także inne komórki rezydujące w obrębie mięśni szkieletowych, tj. fibroblasty i fibrocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, komórki nerwowe, adipocyty oraz różne typy komórek układu odpornościowego (Alameddine, 2012, Alameddine and Morgan, 2016, Carmeli et al., 2004). Wykazano, że enzymy te uczestniczą w aktywacji komórek satelitowych. Poziom syntezy poszczególnych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej zmienia się także w trakcie różnicowania mioblastów w miotuby. W hodowlach *in vitro* mysich mioblastów linii C2C12 oraz w hodowlach pierwotnych ludzkich mioblastów MMP-9 była syntetyzowana jedynie przez pojedyncze komórki przed rozpoczęciem fuzji. MMP-2 była natomiast syntetyzowana zarówno przez proliferujące komórki jak i w czasie różnicowania mioblastów. Wykazano także, że metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej zaangażowane są w fuzję, a zahamowanie ich aktywności hamuje fuzję mioblastów linii C2C12 (Brzoska et al., 2011, Carmeli et al., 2004, Chen and Li, 2009, Guerin and Holland, 1995, Lewis et al., 2000).

W nieuszkodzonych mięśniach poziom ekspresji jak i aktywność żelatynaz pozostaje bardzo niska lub niewykrywalna. Jednym z czynników stymulujących syntezę lub aktywność żelatynaz w mięśniach szkieletowych wydają się być uszkodzenie tkanki. Wykazano, że nastrzykiwanie mysich mięśni kardiotoxyną, powodujące miejscową destrukcję tkanki, skutkuje wzrostem aktywności zarówno MMP-9 jak i MMP-2. Co istotne, wzrost ekspresji i aktywności enzymów przebiega sekwencyjnie. Początkowo, na etapie miolizy, w uszkodzonych mięśniach



poziom MMP-9 przewyższa MMP-2, później, na etapie rekonstrukcji, aktywność MMP-2 staje się dominująca (Kherif et al., 1998, Kherif et al., 1999).

Wzrost syntezy czy aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej towarzyszy także wielu stanom patologicznym mięśni szkieletowych. Miopatie były pierwszymi zbadanymi stanami patologicznymi mięśni, w których enzymy te odgrywają kluczową rolę. Dla przebiegu choroby charakterystyczne są powtarzające się cykle degradacji i regeneracji tkanki, czemu towarzyszy nadmierna akumulacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W wielu miopatiach ekspresja MMP-9, MMP-2, MMP-1 czy MMP-7 jest podwyższona (Carmeli et al., 2004, Choi and Dalakas, 2000, Kieseier et al., 2001, Schoser et al., 2002). Analizy mięśni kontrolnych oraz mięśni myszy mdx czy psów CXMD, będących zwierzęcymi modelami dystrofii mięśniowej Duchenne'a, wykazały że poziom syntezy MMP-9 jest podwyższony w degenerujących mięśniach, a wzrost syntezy MMP-2 towarzyszy etapowi formowania włókien regenerujących (Abdel-Salam et al., 2009, Fukushima et al., 2007, Hindi et al., 2013, Li et al., 2009, Shiba et al., 2015, Zanotti et al., 2007).

Mięśnie dystroficzne charakteryzuje nieprawidłowy układ włókien oraz nadmierna akumulacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Podobne obserwacje dotyczą procesów zachodzących po uszkodzeniu mechanicznym w mięśniach wolnych. Ponieważ nieprawidłowej regeneracji w mięśniach dystroficznych towarzyszą zmiany w poziomie ekspresji czy aktywności metaloproteinaz, postawiłam hipotezę badawczą, zgodnie z którą różnice w efektywności regeneracji mięśni z przewagą włókien wolnych i szybkich mogą wynikać z różnic w poziomie ekspresji/ aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej: MMP-9 i MMP-2.

Analizie poddałam regenerujące mięśnie Soleus i EDL szczurów (*in vivo*) i wyizolowane z nich komórki satelitowe (*in vitro*). Uzyskane wyniki wykazały charakterystyczną sekwencję pojawiania się aktywności MMP-9 (wyższy poziom na etapie proliferacji) i MMP-2 (związaną z etapem fuzji) podczas różnicowania mioblastów, potwierdzając wcześniejsze doniesienia dotyczące linii komórkowych np. mioblastów C2C12. Wyizolowane z mięśni wolnych i szybkich mioblasty nie różniły się od siebie pod względem lokalizacji, ekspresji czy aktywności MMP-9 i MMP-2. Co ciekawe, aktywność obu enzymów była różna w czasie naprawy mięśni wolnych i szybkich. W prawidłowo regenerujących mięśniach szybkich widoczna była charakterystyczna sekwencja pojawiania się i zanikania aktywności MMP-9 i MMP-2 w fazie miolizy i rekonstrukcji. Wzrost aktywności MMP-9 towarzyszył fazie miolizy, podczas gdy aktywność MMP-2 zwiększała się na etapie rekonstrukcji mięśnia. Natomiast moje analizy mięśni wolnych po raz pierwszy wykazały utrzymujący się wysoki poziom aktywności MMP-9 zarówno po uszkodzeniu, jak i na etapie odbudowy włókien. Wydaje się, że przedłużająca się wysoka aktywność MMP-9 utrudnia

prawidłowe przekształcenie środowiska zewnątrzkomórkowego mioblastów i tworzenie się nowych włókien mięśniowych, tym samym zaburzając naprawę tkanki.

Działanie MMP regulowane jest na różnych poziomach: transkrypcji, translacji, sekrecji, lokalizacji, aktywacji, inhibicji oraz degradacji (Alameddine, 2012, Apte and Parks, 2015, Fields, 2015). Wykazano, że modyfikacja ekspresji MMP skutkuje poprawą regeneracji mięśni np. myszy pozbawione funkcjonalnego genu kodującego MMP-2- charakteryzuje mniejsza atrofia mięśni w porównaniu do myszy kontrolnych oraz prawidłowy poziom kolagenu IV i lamininy (Liu et al., 2010). Skoro różnicom w naprawie mięśni wolnych i szybkich towarzyszą różnice w poziomie badanych enzymów postawiłam hipotezę badawczą, zgodnie z którą wyciszenie ekspresji MMP-2 lub MMP-9 może mieć wpływ na proces różnicowania mioblastów, potencjalnie modyfikując przebieg regeneracji, szczególnie w przypadku mięśni wolnych. Materiałem do doświadczeń były komórki satelitowe wyizolowane z mięśni Soleus dorosłych samców szczurów. Określałam ekspresję oraz aktywność MMP-2 i MMP-9 w czasie różnicowania mioblastów *in vitro*. Uzyskane wyniki wykazały, że wyciszenie, przy wykorzystaniu specyficznego siRNA, ekspresji MMP-9 opóźnia proliferację mioblastów oraz formowanie miotub. Obniżenie ekspresji MMP-2 nie wpłynęło natomiast na żaden z tych procesów. Zatem to MMP-9, a nie MMP-2 wydaje się być kluczowym regulatorem różnicowania mioblastów. Postawiłam sobie jednak pytanie, czy modyfikacja działania enzymu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej regenerującego mięśnia szkieletowego wpłynęłaby na proces naprawy uszkodzonej tkanki?

Na poziomie środowiska zewnątrzkomórkowego mięśni regulacja działania MMP dotyczy przede wszystkim kontroli aktywności enzymu. MMP syntetyzowane i wydzielane są w formie nieaktywnej, jako tzw. zymogeny. Zymogen może być aktywowany w macierzy zewnątrzkomórkowej na wiele sposobów: poprzez rozcięcie przez inne enzymy z rodziny MMP, przez działanie innych enzymów np. aktywatora plazminogenu, czy konwertazy, czy poprzez działanie aktywnych form tlenu. Natomiast działanie zaktywowanych MMP może być regulowane bądź przez specyficzne tkankowo inhibitory z rodziny TIMP (z ang. tissue inhibitors of metalloproteinases), bądź przez inhibitory niespecyficzne, np.  $\alpha$ 2-makroglobulinę czy zakotwiczoną w błonie glikoproteinę RECK (z ang. reversion-inducing-cysteine-rich protein) (Alexius-Lindgren et al., 2014, Arpino et al., 2015, Bourbonliou and Stetler-Stevenson, 2010, Visse and Nagase, 2003).

Skoro wysoka aktywność MMP obserwowana w słabo regenerującym mięśniu Soleus, w porównaniu do prawidłowo regenerującego mięśnia EDL, zaburza przekształcenie macierzy zewnątrzkomórkowej po uszkodzeniu mięśnia, postawiłam hipotezę badawczą, zgodnie z którą zahamowanie aktywności metaloproteinaz spowoduje poprawę przebiegu procesu regeneracji wolnych mięśni szkieletowych.

Aktywność metaloproteinaz hamowana była poprzez działanie specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko MMP-9 lub MMP-2 albo poprzez działanie doksycykliny - niespecyficznego inhibitora MMP. Określałam zmiany morfologiczne w czasie regeneracji mięśni Soleus oraz podczas różnicowania mioblastów *in vitro*, w odniesieniu do zmian aktywności enzymów. Uzyskane wyniki wykazały, że zablokowanie aktywności MMP-9 znacząco hamuje proliferację mioblastów oraz formowanie miotubów *in vitro*. Zablokowanie aktywności MMP-2 nie wpływało natomiast znacząco na podziały komórek, hamując równocześnie fuzję mioblastów w miotuby. Co ciekawe, hamowanie działania enzymów *in vivo* znacząco poprawiało regenerację uszkodzonych mięśni wolnych. Efekt ten był szczególnie wyraźny w przypadku hamowania działania MMP-9. Nastrzykiwanie uszkodzonego mięśnia Soleus przeciwciałem przeciwko MMP-9 lub doksycykliną powodowało zarówno wzrost liczby i średnicy nowotworzonych włókien mięśniowych jak i redukcję fibrozy. Efekt ten nie był widoczny przy nastrzykiwaniu uszkodzonego mięśnia przeciwciałem skierowanym przeciwko MMP-2. Zatem kontrola aktywności MMP-9, ale nie MMP-2 jest ważna dla poprawy regeneracji uszkodzonego mięśnia, szczególnie w nieprawidłowo regenerujących mięśniach wolnych.

Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły zatem na określenie po raz pierwszy różnic w poziomie metaloproteinaz MMP-9 i MMP-2 pomiędzy regenerującymi po uszkodzeniu mechanicznym mięśniami z przewagą włókien wolnych i szybkich. Wykazałam również, że kluczowym enzymem dla prawidłowego przebiegu naprawy tkanki jest metaloproteinaza MMP-9. Utrzymanie odpowiedniego poziomu aktywności MMP-9 w środowisku zewnątrzkomórkowym włókien mięśniowych jest zatem niezbędne dla przebiegu regeneracji, stanowiąc element mechanizmu kontrolującego proces naprawy po uszkodzeniu mechanicznym.

### **Podsumowanie**

Pierwszoplanowym zadaniem badań, których wyniki stanowią podstawę mojej rozprawy habilitacyjnej było zrozumienie mechanizmu, który kieruje uszkodzone mięśnie na drogę prawidłowej regeneracji lub włóknienia. Kluczowa w tym kontekście kontrola przekształcenie środowiska zewnątrzkomórkowego związana jest z kilkoma oddziałującymi na siebie wzajemnie procesami: usunięciem uszkodzonych włókien, uwolnieniem czynników wzrostu i cytokin kontrolujących aktywację, migrację czy różnicowanie obecnych w mięśniach komórek satelitowych oraz przekształceniem macierzy zewnątrzkomórkowej przez obecne w niej enzymy.

Wyniki badań wchodzących w skład mojej rozprawy habilitacyjnej pozwoliły na scharakteryzowanie różnic w środowisku zewnątrzkomórkowym włókien mięśniowych wolnych i szybkich mięśni szkieletowych determinujących przebieg naprawy tkanki mięśniowej po uszkodzeniu. Wykazałam, że zarówno na poziomie komórkowym (rozwój i wyciszenie stanu zapalnego) jak i molekularnym (aktywność metaloproteinaz MMP-9 i MMP-2 oraz czynnika wzrostu TGFβ1) występują znaczące rozbieżności pomiędzy prawidłowo regenerującymi mięśniami szybkimi a ulegającymi fibrozie mięśniami wolnymi. W nieprawidłowo regenerującym mięśniu wolnym zaburzona jest równowaga pomiędzy aktywacją a wyciszeniem poszczególnych elementów kontrolujących przebieg naprawy tkanki.

Wydaje się, że obniżenie aktywności enzymu wydzielanego w pierwszych etapach po uszkodzeniu tzn. MMP-9 jest kluczowe dla prawidłowej naprawy tkanki. Pozostałości błony podstawnej funkcjonują jako rusztowanie dla nowopowstających włókien mięśniowych lub nowo formowanego unerwienia. Nadmierna aktywność MMP-9 może uniemożliwiać utrzymanie się prawidłowego rusztowania koniecznego do zajścia efektywnej regeneracji mięśnia szkieletowego. W konsekwencji, regenerujące mięśnie nie są zdolne do odbudowy. Z drugiej strony, jako, że MMP-9 jest czynnikiem związanym ze zdolnością neutrofilów do migracji przez błonę podstawną do uszkodzonej tkanki, kluczowe może być w tym przypadku zahamowanie nadmiernej infiltracji komórek stanu zapalnego. Nasiloną reakcją zapalną w obszarze nekrotycznym prowadzić może bowiem do dalszego ogniskowego uwolnienia MMP-9 oraz nadmiernej syntezy TGFβ1, który bierze udział zarówno w przekształceniu środowiska zewnątrzkomórkowego włókien mięśniowych, jak w hamowaniu różnicowania mioblastów w miotuby. Dodatkowo, akumulowane składniki macierzy zewnątrzkomórkowej mogą wpływać na kontrolę przebiegu procesu regeneracji poprzez wiązanie TGFβ1 w środowisku uszkodzonych włókien, modyfikując jego działanie. Nadmierna aktywność TGFβ1 promując syntezę strukturalnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej przyczynić się może do dalszego nasilenia procesu ich akumulacji, prowadząc do pogłębienia rozwoju fibrozy. Wpływać może także na kontrolę ekspresji enzymów degradujących macierz, przyczyniając się prawdopodobnie do utrzymania w nieprawidłowo regenerującym mięśniu wolnym wysokiej aktywności MMP-9 na późniejszych etapach po uszkodzeniu. Wysoki poziom MMP-9 utrzymujący się długo po uszkodzeniu może natomiast stymulować napływ drugiej fali neutrofilów do uszkodzonej tkanki. Pociąga to za sobą napływ makrofagów, które w warunkach nieprawidłowej akumulacji składników macierzy, stymulowane są do produkcji TGFβ1. Zatem zablokowanie działania zarówno MMP-9 jak i TGFβ1 przeciwdziała w konsekwencji rozwojowi fibrozy i znacznie

poprawia efektywność naprawy uszkodzonej tkanki, pozwalając na przywrócenie prawidłowej architektury i funkcjonowania mięśni.

Prowadzone badania były w dużej części finansowane przez dwa projekty MNiSW, którymi kierowałam, a realizacja osiągnięcia była możliwa dzięki wykorzystaniu zarówno klasycznych, jak i nowoczesnych metod badawczych. Wymagała ode mnie wiedzy i doświadczenia związanego zarówno z operacjami na zwierzętach czy hodowlami komórek w warunkach *in vitro* jak i opanowania metod związanych z wieloma technikami z dziedziny biologii molekularnej czy biologii komórki.

### **Plany naukowe**

Regeneracja mięśni szkieletowych jest procesem złożonym. Komórki satelitowe, infiltrujące miejsce uszkodzenia komórki stanu zapalnego oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej w uszkodzonej tkance mięśniowej tworzą złożone środowisko sygnalizacyjne, które przyczynia się do skutecznej naprawy mięśni lub, alternatywnie, do rozwoju włóknienia. Zahamowanie procesów włóknienia na rzecz mechanizmów naprawczych, znacznie poprawiłoby efektywność regeneracji mięśni.

Planowane przeze mnie dalsze badania mają na celu określenie mechanizmu, w jaki zahamowanie aktywności TGFβ1 lub MMP wpływa na charakter, czas trwania i intensywność reakcji zapalnej. Określenie możliwości modyfikacji przebiegu stanu zapalnego nie tylko umożliwiłoby zrozumienie różnic w regeneracji, ale także mogłoby stworzyć szansę na opracowanie terapii ograniczającej napływ komórek stanu zapalnego do uszkodzonego mięśnia i poprawę regeneracji mięśni wolnych. W planowanych badaniach skupię się również na interakcjach pomiędzy TGFβ1 i MMP-9 oraz MMP-2, określając wpływ zahamowania TGFβ1 na ekspresję i/lub aktywność MMP-9 i MMP-2 oraz ich endogennych inhibitorów, ze szczególnym uwzględnieniem określenia zależnych od TGFβ1 szlaków sygnalizacyjnych kierujących tymi oddziaływaniami. O ile rola TGFβ1 w regulacji syntezy białek macierzy w mięśniach szkieletowych jest dobrze znana, udział tego czynnika w regulacji aktywności enzymów takich jak MMP nie jest dobrze udokumentowany. Określenie mechanizmów kontrolujących ekspresję inhibitorów MMP za pośrednictwem TGFβ1 może wyjaśnić sposób, w jaki czynnik ten wpływa na przekształcenie macierzy zewnątrzkomórkowej. Może również umożliwić zaprojektowanie odpowiednich metod terapeutycznych służących do wspomagania naprawy mięśni szkieletowych.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Oprócz sześciu prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe jestem także współautorem siedmiu prac oryginalnych i siedmiu przeglądowych. Prace oryginalne koncentrują się na różnych aspektach regeneracji mięśni szkieletowych, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości poprawy efektywności naprawy uszkodzonej tkanki.

***Określenie poziomu aktywności enzymatycznej kalpain w czasie regeneracji mięśni szkieletowych szczura *in vivo* oraz proliferacji i różnicowania komórek satelitowych *in vitro*.  
Udział funkcjonalnych analogów siarczanu heparanu w regulacji aktywności enzymów.***

- [Zimowska M](#), Constantin B, Papy-Garcia D, Raymond G, Cognard C, Caruelle JP, Moraczewski J, and Martelly I (2005) Novel Glycosaminoglycan Mimetic (RGTA, RGD120) Contributes to Enhance Skeletal Muscle Satellite Cell Fusion by Increasing Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Calpain Activity. *J Cell Physiol* 205:237–245
- [Zimowska M](#), Szczepankowska D, Streminska W, Papy D, Tournaire MC, Gautron J, Barritault D, Moraczewski J, Martelly I (2001) Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration *J Cell Physiol* 188, 178-187 (przed doktoratem)
- Moraczewski J, Piekarska E, [Zimowska M](#), Sobolewska M, (1996) Calpain I and II in regenerating slow and fast twitch muscles of rat. *Act Bioch Pol* 43, 693-700. (przed doktoratem)

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorem 2 prac dotyczących udziału kalpain w regeneracji mięśni szkieletowych szczura *in vivo* oraz w kontroli proliferacji i różnicowania komórek satelitowych szczura *in vitro*. Prace te prezentowały także wyniki doświadczeń mających na celu określenie możliwości modyfikacji aktywności kalpain jako sposobu poprawy regeneracji mięśni szkieletowych. Tematyka ta była przeze mnie kontynuowana również po uzyskaniu stopnia doktora.

Kalpainy, zależne od wapnia wewnątrzkomórkowe nielizosomalne proteazy tiolowe, pełniące funkcję endopeptydaz, stanowią dużą rodzinę enzymów, którą można podzielić na dwie grupy: kalpainy ubikwistyczne, znajdujące w wielu tkankach, takich jak mięśnie, wątroba, mózg czy kości oraz kalpainy tkankowo specyficzne, których ekspresja związana jest z określoną tkanką. W mięśniach szkieletowych kalpainy odpowiedzialne są za degradację białek miofibrilarnych, takich jak np. desmina, filamina, białko C, tropomiozyna, troponina T, troponina I, titina, nebulina wimentyna czy winkulina (Kinbara et al., 1998, Tidball and Spencer, 2000).

W moich badaniach skoncentrowałam się na dwóch ubikwistycznych kalpainach: mikro- i mili kalpainie. Izoformy te różnią się od siebie pod względem stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  niezbędnych do ich aktywności: aktywacja mikro kalpainsy wymaga 3-50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , podczas gdy mili kalpainsy - 200-1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Reverter et al., 2001, Sorimachi and Suzuki, 2001, Suzuki et al., 2004). Badania prowadzone były we współpracy z Laboratorium CRRET (Laboratoire de recherche sur la Croissance cellulaire, la Reparation et la Regeneration Tissulaires), Faculte de Sciences et Technologie, Universite Paris XII (Francja). Materiałem do doświadczeń były regenerujące mięśnie Soleus i EDL dorosłych samców szczurów (*in vivo*). Przeprowadziłam również doświadczenia na wyizolowanych z obu mięśni komórkach satelitowych (*in vitro*). Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, zgodnie z którą aktywność kalpain związana jest z proteolizą i degradacją włókien mięśniowych *in vivo*. Wykazałam także, że aktywność każdej z izoform enzymu związana była z inną fazą regeneracji mięśni. O ile aktywność mili kalpainsy związana była z końcem fazy miolizy i rozpoczęciem naprawy tkanki, aktywność mikro kalpainsy osiągała najwyższy poziom na późniejszym etapie regeneracji. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że różnicowanie komórek satelitowych także związane jest ze zmianami aktywności kalpain, a mikro i mili kalpaina pełnią różne role regulatorowe i funkcjonalne. Zatem ze względu na ich udział w degradacji białek mięśniowych, kalpainsy okazały się potencjalnie ważnym celem badań terapeutycznych, a zbadanie możliwości modyfikacji ich aktywności mogłoby być kluczowe dla leczenia wielu stanów pourazowych czy patologicznych mięśni szkieletowych.

Czynnikami zdolnymi do stymulacji naprawy szeregu tkanek, wpływającymi również hamująco na rozwój fibrozy są funkcjonalne analogi siarczanu heparanu - RGTA (ReGeneraTing Agent). Funkcjonalne analogi siarczanu heparanu, syntetyzowano i opatentowano w laboratorium CRRET na Uniwersytecie ParisXII. Otrzymano je przez kontrolowane przyłączenie karboksymetylowych, karbometylowo-benzylamidowych i karboksymetylowo-benzylamidowych grup siarczanowych do reszt glukozowych dekstranu T40 (Mauzac and Jozefonvicz, 1984). RGTA działają podobnie do siarczanu heparanu, zachowując jego zdolności do oddziaływań z czynnikami wzrostu. Poprzez wiązanie, chronią również związane czynniki wzrostu przed proteolityczną degradacją (Meddahi et al., 1995). Funkcjonalne analogi siarczanu heparanu hamują również aktywność plazminy i elastazy leukocytarnej, redukując wpływ komórek stanu zapalnego na regenerację (de Raucourt et al., 1998, Ledoux et al., 2000, Mauray et al., 1998, Meddahi et al., 1995, 1996).

Skoro funkcjonalne analogi siarczanu heparanu zdolne są do przyspieszenia i poprawy regeneracji, a kalpainsy są enzymami zaangażowanymi w degradację białek miofibrylarnych towarzysząc uszkodzeniu i naprawie mięśni szkieletowych, postawiłam hipotezę, zgodnie z którą zmiany w środowisku pozakomórkowym regenerujących mięśni mogą pośrednio wpływać na

aktywność kalpain, przyczyniając się do zmian w efektywności regeneracji mięśni. Badania prowadzone były przy wykorzystaniu szczurzego modelu regeneracji mięśni wolnych (Soleus) i szybkich po uszkodzeniu mechanicznym. Dodatkowo przeprowadziłam serię doświadczeń na wyizolowanych z obu mięśni komórkach satelitowych (*in vitro*). Uzyskane wyniki wykazały, że funkcjonalne analogi siarczanu heparanu przyspieszają zarówno proces regeneracji mięśni szkieletowych jak i fuzję mioblastów *in vitro*. Towarzyszył temu wzrost stężenia wolnego wapnia wewnątrzkomórkowego i wzrost aktywności badanych enzymów. Zatem wydaje się, że w środowisku pozakomórkowym funkcjonalne analogi siarczanu heparanu wiążąc się z białkami macierzy pozakomórkowej wpływają na stabilizację jej struktury, przyczyniając się do odbudowy środowiska komórkowego niezbędnego do aktywacji komórek satelitowych. Towarzyszy temu modyfikacja poziomu jonów wapnia. Indukowany funkcjonalnymi analogami siarczanu heparanu wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  umożliwia aktywację milli kalpains, sprzyjając procesowi fuzji.

#### **Określenie roli jądrowej lokalizacji metaloproteiny MMP-9 w czasie proliferacji mioblastów**

- [Zimowska M, Swierczyńska M, Ciemerych MA \(2013\) Nuclear MMP-9 role in the regulation of rat skeletal myoblasts Biol Cell Aug;105\(8\):334-44](#)

Kolejnym tematem badawczym, który realizowałam w czasie mojej pracy zawodowej było określenie udziału metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9 i MMP-2 w regeneracji mięśni szkieletowych. Przy okazji badań, które stały się podstawą mojego osiągnięcia habilitacyjnego, przeprowadziłam dodatkowe analizy nietypowej, jak się wydawało, jądrowej lokalizacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, którą zaobserwowałam w trakcie prowadzonych eksperymentów.

Podstawową funkcją MMP jest przekształcanie macierzy zewnątrzkomórkowej. Chociaż enzymy te działają głównie zewnątrzkomórkowo, dane literaturowe wskazują, że niektóre z nich lokalizowane są również w komórce. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja może być związana np. z obecnością MMP tuż przed ich wydzieleniem do macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak, co ciekawe, MMP wykrywane były także w jądrach komórkowych wielu typów komórek (Cauwe and Opendakker, 2010, Mannello and Medda, 2012). Wykazano np., że MMP-1 jest obecna w jądrach komórek nowotworowych raka wątrobowo-komórkowego. Co ciekawe nie wykryto jej w prawidłowych hepatocytach wyizolowanych z ludzkiej wątroby (Ip et al., 2007). Lokalizację jądrową MMP-3 obserwowano w ludzkich komórkach HepG2, miofibroblastach z wątroby (Si-Tayeb et al., 2006). MMP-9 wykryto natomiast w jądrach ludzkich i szczurzych neuronów, jak



również w ludzkich komórkach glejowych (Pirici et al., 2012), komórkach neuroblastomy i makrofagach szpiku kostnego (Sans-Fons et al., 2010).

Moje badania prowadzone były przy wykorzystaniu hodowli *in vitro* wyizolowanych z mięśni szczura mioblastów. Zaobserwowałam lokalizację metaloproteiny MMP-9 w niektórych jądrach komórkowych proliferujących mioblastów. W celu dokładniejszej analizy tego zjawiska określiłam poziom MMP-9 i MMP-2 w jądrach komórkowych mioblastów. Uzyskane wyniki wykazały, że MMP-9 lokalizuje się w jądrach mioblastów pozostających w fazie S cyklu komórkowego. Zablockowanie aktywności MMP poprzez traktowanie komórek doksycyliną, TIMP-1 lub przeciwciałem przeciwko MMP-9 powodowało znaczące zmniejszenie liczby komórek w fazie S i zahamowanie proliferacji mioblastów. Zatem, wewnątrzjądrowa aktywność MMP-9 podczas różnicowania mioblastów może być związana z regulacją cyklu komórkowego. Jednak zrozumienie mechanizmu tego zjawiska wymaga dalszych badań.

#### **Określenie wpływu czynnika SDF-1 na proces regeneracji mięśni szkieletowych**

- Kowalski K, Markowska-Zagrajek A, Plaskota I, Kowalewska M, Archacki R, Archacka K, Czerwińska A M, Grabowska I, Zimowska M, Jańczyk-Ilach K, Stremińska W, Ciemerych M A, Brzoska-Wójtowicz E (2012) The role of SDF-1 in regeneration and cancerogenesis process Postepy Polskiej Farmacji i Medycyny 2 (1), 29-38
- Brzoska E, Kowalewska M, Markowska A, Kowalski K, Archacka K, Zimowska M, Grabowska I, Czerwińska A, Góra M, Stremińska W, Jańczyk-Ilach K, Ciemerych MA (2012) The Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilization of Cxcr4 and CD34 expressing cells Biol Cell. 104(12):722-37

W czasie realizacji własnych celów badawczych, współpracowałam także z członkami Zakładu Cytologii, analizując inne aspekty regeneracji mięśni szkieletowych. Jednym z zagadnień badanych przez nasz zespół było określenie wpływu czynnika SDF-1 na regenerację mięśni szkieletowych.

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) należy do rodziny cytokin. Jego związanie z receptorem CXCR4 lub CXCR7 aktywuje ścieżki sygnalizacyjne zależne od kinaz białkowych JAK, STAT, MAP czy Akt. Głównym źródłem SDF-1 w tkankach organizmów dorosłych jest szpik kostny, gdzie SDF-1 odpowiedzialny jest za mobilizację komórek macierzystych i progenitorowych do krwi obwodowej. Czynnikiem ten jest również produkowany w uszkodzonych narządach lub tkankach takich jak np. serce oraz mięśnie szkieletowe, a także w wątrobie, płucach, węzłach chłonnych, czy śledzionie. SDF-1 poprzez oddziaływanie ze swoimi receptorami CXCR4 lub CXCR7 zaangażowany jest w regulację wielu procesów zarówno fizjologicznych jak i

patologicznych. Zaliczyć do nich można proliferację, różnicowanie, migrację czy adhezję komórek normalnych oraz przerzutowanie komórek nowotworowych (Juarez et al., 2004, Kucia et al., 2004, Nagasawa, 2000, Ratajczak et al., 2006). W mięśniach szkieletowych rola SDF-1 i CXCR4 została dobrze scharakteryzowana podczas miogenezy. Wczesna miogeneza zależy od obecności CXCR4 i SDF-1, które regulują migrację i przeżywalność komórek progenitorowych mięśni szkieletowych. Brak tych czynników powoduje nieprawidłowy rozwój mięśni szkieletowych (Chong et al., 2007, Melchionna et al., 2010, Rehimi et al., 2010). Niewiele jednak wiadomo było o roli SDF-1 w regeneracji mięśni szkieletowych. Postawiliśmy hipotezę, zgodnie z którą wzrost poziomu SDF-1 wpłynie na poprawę regenerację mięśni szkieletowych poprzez oddziaływanie na migrację komórek satelitowych, ale także przez mobilizację nie-mięśniowych komórek macierzystych wykazujących się ekspresją receptora CXCR4.

Materiałem do doświadczeń były regenerujące mięśnie Soleus dorosłych samców szczurów (*in vivo*) oraz wyizolowane z mięśnia Soleus komórki satelitowe (*in vitro*). Uzyskane wyniki wskazują, że SDF-1 wpływa na poprawę regeneracji mięśni szkieletowych. W mięśniach traktowanych SDF-1 obserwowaliśmy zarówno poprawę morfologii regenerujących włókien jak i obniżenie rozwoju fibrozy. Działanie SDF-1 związane było z indukowaną migracją mioblastów w sposób zależny od CXCR4. Co ciekawe, zwiększeniu zdolności do migracji pod wpływem SDF-1 towarzyszył wzrost aktywności kluczowych enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Ponadto do mięśni traktowanych SDF-1 napływały licznie komórki wykazujące ekspresję markera CD34. Wydaje się zatem, że SDF-1 może aktywować i mobilizować komórki macierzyste i prekursorowe mięśni, ale co istotne, może również wpływać na mobilizację niemięśniowych komórek macierzystych, które mogłyby uczestniczyć w tworzeniu nowych włókien.

#### ***Określenie wpływu chowu selekcyjnego w kierunku zwiększenia masy ciała myszy na mięśnie szkieletowe.***

- Wirth-Dzięciołowska E, Zimowska M, Gajewska M, Żmuda M, Rosochacki S (2011) Differential growth of skeletal muscle in mice selected divergently over 108 generations for low and high body weight. *Animal Science Papers and Reports* vol. 29 no. 2, 161-177
- Rosochacki S J, Wirth-Dzięciołowska E, Zimowska M, Sakowski T, Połozynowicz J, Juszcuk-Kubiak E, and Gajewska M (2005) Skeletal muscle and liver protein degradation in mice divergently selected for low and high body weight over 108 generations *Arch Anim Breed* 48 5, 505-517

Ostatnim z tematów badawczych, w realizację którego byłam zaangażowana, było określenie wpływu chowu selekcyjnego, mającego na celu zwiększenia masy ciała, na mięśnie szkieletowe. Badania prowadzone były we współpracy z Instytutem Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu oraz Katedrą Genetyki i Żywienia Zwierząt, SGGW w Warszawie.

Głównym celem ukierunkowanej selekcji mającej na celu zwiększenie masy ciała u zwierząt jest uzyskanie większej masy mięśniowej, co z kolei wiąże się ze zwiększeniem zawartości białka i tłuszczu w mięśniach. Badania dotyczące różnic pomiędzy myszami wyselekcjonowanymi pod względem wysokiej lub niskiej masy ciała wykazały m.in. różnice w liczbie i rozmiarach adipocytów. Postawiliśmy hipotezę, zgodnie z którą różnicom w całkowitej masie ciała wyselekcjonowanych mysich linii towarzyszą zmiany udziału masy mięśniowej wynikające m.in. z modyfikacji poziomu miogenicznych czynników regulatorowych w mięśniach, czy aktywności niektórych lizosomalnych enzymów proteolitycznych zaangażowanych w degradację białek mięśniowych.

Materiałem do doświadczeń były wyselekcjonowane pod względem masy ciała myszy lekkie i ciężkie. Uzyskane wyniki wykazały, że znaczącym różnicom w masie mięśni towarzyszyły zmiany w wielkości włókien mięśniowych. Liczba włókien mięśniowych o dużej średnicy wzrastała z wiekiem zwierząt. Różnice widoczne były także pomiędzy badanymi liniami. Towarzyszyły temu zmiany w poziomie miogenicznych czynników regulatorowych i aktywności enzymatycznej. Co ciekawe, większy udział katepsyny D w przebudowie mięśnia stwierdzono u linii L myszy natomiast u zwierząt wyselekcjonowanych ze względu na wyższą masę ciała znacznie bardziej widoczny był udział proteinaz tiolowych.

W czasie realizacji badań związanych z przygotowaniem rozprawy habilitacyjnej byłam również współautorem prac przeglądowych. Prace te dotyczyły czynników obecnych w środowisku zewnątrzkomórkowym tj. metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej czy czynnik wzrostu TGF $\beta$ , procesu regeneracji mięśni szkieletowych oraz właściwości komórek macierzystych.

Prace przeglądowe:

- Archacka, K., Brzoska, E., Ciemerych, M.A., Czerwinska, A.M., Grabowska, I., Kowalski, K.K., [Zimowska, M.](#), (2018) Pluripotent and Mesenchymal Stem Cells - Challenging Sources for Derivation of Myoblast, in: Brzoska, Z., Jastrzebska, E. (Eds.), Cardiac Cell Culture Technologies. Springer International Publishing AG, 109-154.[doi.org/10.1007/978-3-319-70685-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70685-6_6)

- Jung P., Zimowska M. (2016) Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju, fizjologii i procesach degeneracyjnych mięśni szkieletowych, *Postępy Biochemii*, vol. 62, nr 1: 25-35
- Brzoska E., Ciemerych M. A., Przewoźniak M., Zimowska M (2011). Regulation of muscle stem cells activation – the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitamins and hormones* Vol. 87, 239-276
- Olszyński K, Zimowska M. Structure and function of matrix metalloproteinases (MMP) (2009) *Post.Bioch* vol. 55, nr 1, 76-84
- J. Moraczewski, K. Archacka, E. Brzoska, M. A. Ciemerych, I. Grabowska, K. Jańczyk-Ilach, W. Stremińska, M. Zimowska From Planarians to mammals – the many faces of regeneration (2008) *Int. J. Dev. Biol.* 52:219-227
- Zimowska M. Signaling pathways of Transforming Growth Factor  $\beta$  family members (2006) *Post.Bioch* vol. 52, nr 4, 360-366

#### Bibliografia

- Abdel-Salam E, Abdel-Meguid I, Korraa SS. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases.* 2009;28:94-100.
- Abrigo J, Simon F, Cabrera D, Cordova G, Trollet C, Cabello-Verrugio C. Central Role of Transforming Growth Factor Type Beta 1 in Skeletal Muscle Dysfunctions: An Update on Therapeutic Strategies. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19:1189-200.
- Alameddine HS. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiology of disease.* 2012;48:508-18.
- Alameddine HS, Morgan JE. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3:455-73.
- Alexius-Lindgren M, Andersson E, Lindstedt I, Engstrom W. The RECK gene and biological malignancy--its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. *Anticancer Res.* 2014;34:3867-73.
- Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2015;44-46:1-6.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204:1057-69.
- Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:247-54.
- Bassaglia Y, Gautron J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *Journal of muscle research and cell motility.* 1995;16:420-9.
- Blobe GC, Liu X, Fang SJ, How T, Lodish HF. A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276:39608-17.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010;20:161-8.
- Brandan E, Gutierrez J. Role of proteoglycans in the regulation of the skeletal muscle fibrotic response. *The FEBS journal.* 2013;280:4109-17.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:207-14.
- Brzoska E, Ciemerych MA, Przewoźniak M, Zimowska M. Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitam Horm.* 2011;87:239-76.
- Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of athletic training.* 2006;41:457-65.

- Caceres S, Cuellar C, Casar JC, Garrido J, Schaefer L, Kresse H, Brandan E. Synthesis of proteoglycans is augmented in dystrophic mdx mouse skeletal muscle. *European journal of cell biology*. 2000;79:173-81.
- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*. 2004;29:191-7.
- Cauwe B, Opendakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010;45:351-423.
- Cencetti F, Bernacchioni C, Nincheri P, Donati C, Bruni P. Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis. *Mol Biol Cell*. 2010;21:1111-24.
- Chaikuad A, Bullock AN. Structural Basis of Intracellular TGF-beta Signaling: Receptors and Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*. 2004;84:209-38.
- Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*. 2014;219:172-8.
- Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr*. 2009;3:337-41.
- Choi YC, Dalakas MC. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology*. 2000;54:65-71.
- Chong SW, Nguyet LM, Jiang YJ, Korzh V. The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish. *BMC Dev Biol*. 2007;7:54.
- Cote CH, Tremblay MH, Duchesne E, Lapoite BM. Inflammation-induced leukocyte accumulation in injured skeletal muscle: role of mast cells. *Muscle & nerve*. 2008;37:754-63.
- de Raucourt E, Mauray S, Chaubet F, Maiga-Revel O, Jozefowicz M, Fischer AM. Anticoagulant activity of dextran derivatives. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:49-57.
- Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol*. 2012;189:3669-80.
- Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Comprehensive Physiology*. 2015;5:1027-59.
- Fadic R, Mezzano V, Alvarez K, Cabrera D, Holmgren J, Brandan E. Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10:758-69.
- Fields GB. New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol*. 2015;44-46:239-46.
- Fu X, Wang H, Hu P. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72:1663-77.
- Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:54.
- Guerin CW, Holland PC. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn*. 1995;202:91-9.
- Hata A, Chen YG. TGF-beta Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8.
- Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8.
- Hinck AP. Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily. *FEBS Lett*. 2012;586:1860-70.
- Hinck AP, O'Connor-McCourt MD. Structures of TGF-beta receptor complexes: implications for function and therapeutic intervention using ligand traps. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:2081-98.
- Hindi SM, Shin J, Ogura Y, Li H, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves proliferation and engraftment of myogenic cells in dystrophic muscle of mdx mice. *PloS one*. 2013;8:e72121.
- Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;96:447-62.
- Ip YC, Cheung ST, Fan ST. Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2007;46:225-30.
- Juarez J, Bendall L, Bradstock K. Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1245-59.
- Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2000;10:332-7.
- Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo*. 2009;23:779-96.
- Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:491497.
- Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998;24:309-19.
- Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol*. 1999;205:158-70.

- Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJ, Gold R, Toyka KV, Hartung HP. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain*. 2001;124:341-51.
- Kim J, Lee J. Role of transforming growth factor-beta in muscle damage and regeneration: focused on eccentric muscle contraction. *J Exerc Rehabil*. 2017;13:621-6.
- Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Skeletal muscle-specific calpain, p49: structure and physiological function. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:415-20.
- Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids*. 2011;41:271-90.
- Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine*. 2012;10:183.
- Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*. 2004;35:233-45.
- Kurozumi K, Nishita M, Yamaguchi K, Fujita T, Ueno N, Shibuya H. BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells*. 1998;3:257-64.
- Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop*. 2016;3:15.
- Ledoux D, Papy-Garcia D, Escartin Q, Sagot MA, Cao Y, Barritault D, Courtois J, Hornebeck W, Caruelle JP. Human plasmin enzymatic activity is inhibited by chemically modified dextrans. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:29383-90.
- Lewis MP, Tippet HL, Sinanan AC, Morgan MJ, Hunt NP. Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures. *Journal of muscle research and cell motility*. 2000;21:223-33.
- Li H, Mittal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2009;18:2584-98.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*. 2006;24:99-146.
- Liu X, Lee DJ, Skittone LK, Natsuhara K, Kim HT. Role of gelatinases in disuse-induced skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve*. 2010;41:174-8.
- Luo K. Signaling Cross Talk between TGF-beta/Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9.
- MacDonald EM, Cohn RD. TGFbeta signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24:628-34.
- Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massague J. Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40:296-308.
- Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res*. 2018.
- Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem*. 2012;47:27-58.
- Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:616-30.
- Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83:8206-10.
- Mauray S, De Raucourt E, Chaubet F, Maiga-Revel O, Sternberg C, Fischer AM. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9:373-87.
- Mauzac M, Jozefonvicz J. Anticoagulant activity of dextran derivatives. Part I: Synthesis and characterization. *Biomaterials*. 1984;5:301-4.
- Meddahi A, Lemdjabar H, Caruelle JP, Barritault D, Hornebeck W. Inhibition by dextran derivatives of FGF-2 plasmin-mediated degradation. *Biochimie*. 1995;77:703-6.
- Meddahi A, Lemdjabar H, Caruelle JP, Barritault D, Hornebeck W. FGF protection and inhibition of human neutrophil elastase by carboxymethyl benzylamide sulfonate dextran derivatives. *Int J Biol Macromol*. 1996;18:141-5.
- Melchionna R, Di Carlo A, De Mori R, Cappuzzello C, Barberi L, Musaro A, Cencioni C, Fujii N, Tamamura H, Crescenzi M, Capogrossi MC, Napolitano M, Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle & nerve*. 2010;41:828-35.
- Motohashi N, Asakura A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2.
- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology*. 2004;16:558-64.
- Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*. 2005;118:3573-84.
- Moyer AL, Wagner KR. Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23:568-73.
- Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 2011;138:3625-37.
- Nagasawa T. A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2000;72:408-11.
- Noirez P, Torres S, Cebrian J, Agbulut O, Peltzer J, Butler-Browne G, Daegelen D, Martelly I, Keller A, Ferry A. TGF-beta1 favors the development of fast type identity during soleus muscle regeneration. *Journal of muscle research and cell motility*. 2006;27:1-8.

- Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *The Journal of pathology*. 2014;232:344-55.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*. 1999;401:480-5.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:221-33.
- Peterson JM, Feeback KD, Baas JH, Pizza FX. Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101:1394-9.
- Pirici D, Pirici I, Mogoanta L, Margaritescu O, Tudorica V, Margaritescu C, Ion DA, Simionescu C, Coconu M. Matrix metalloproteinase-9 expression in the nuclear compartment of neurons and glial cells in aging and stroke. *Neuropathology*. 2012;32:492-504.
- Pizza FX, Peterson JM, Baas JH, Koh TJ. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. *J Physiol*. 2005;562:899-913.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 2006;20:1915-24.
- Rehimi R, Khalida N, Yusuf F, Morosan-Puopolo G, Brand-Saberi B. A novel role of CXCR4 and SDF-1 during migration of cloacal muscle precursors. *Dev Dyn*. 2010;239:1622-31.
- Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Moser CM, Linder S, Khandoga A, Krombach F. Gelatinases mediate neutrophil recruitment *in vivo*: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83:864-74.
- Reverter D, Strobl S, Fernandez-Catalan C, Sorimachi H, Suzuki K, Bode W. Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem*. 2001;382:753-66.
- Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *The FEBS journal*. 2013;280:4118-30.
- Sambasivan R, Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:870-82.
- Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16:15-34.
- Sans-Fons MG, Sole S, Sanfeliu C, Planas AM. Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages. *Am J Pathol*. 2010;177:2870-85.
- Sartori R, Gregorevic P, Sandri M. TGFbeta and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25:464-71.
- Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199:451-63.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011;91:1447-531.
- Schofer BG, Blottner D, Stuerenburg HJ. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. *Acta Neurol Scand*. 2002;105:309-13.
- Serrano AL, Munoz-Canoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Experimental cell research*. 2010;316:3050-8.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685-700.
- Shiba N, Miyazaki D, Yoshizawa T, Fukushima K, Shiba Y, Inaba Y, Imamura M, Takeda S, Koike K, Nakamura A. Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852:2170-82.
- Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol*. 2006;169:1390-401.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*. 2008;38:947-69.
- Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem*. 2001;129:653-64.
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S12-8.
- Teixeira CF, Chaves F, Zamuner SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Gutierrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with Bothrops jararaca snake venom. *International journal of experimental pathology*. 2005;86:107-15.
- Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32:1-5.
- Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol*. 2015;44-46:224-31.
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13:3056-62.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-39.
- Wang T, Donahoe PK. The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors. *Front Biosci*. 2004;9:619-31.
- Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2:47-63.
- Westerblad H, Bruton JD, Katz A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental cell research*. 2010;316:3093-9.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*. 2008;214:199-210.

*Załącznik 3*

*Autoreferat w języku polskim*

- Zanotti S, Gibertini S, Mora M. Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts before and after TGF-beta1 treatment. *Cell Tissue Res.* 2007;339:397-410.
- Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernasconi P, Canioni E, Di Blasi C, Pegoraro E, Angelini C, Ciscato P, Prella A, Mantegazza R, Morandi L, Mora M. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain : a journal of neurology.* 2005;128:2546-55.
- Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9.
- Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282:25852-63.

MZW