

Malwina Taborowska

**STRUKTURA I UNERWIENIE PRZEDZIAŁÓW MIĘŚNIA  
BRZUCHATEGO PRZYŚRODKOWEGO ŁYDKI – BADANIA  
NA MODELU ZWIERZĘCYM**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurobiologii

Akademii Wychowania Fizycznego

im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Promotor: dr hab. Dorota Bukowska, prof. AWF

Promotor pomocniczy: dr Hanna Drzymała-Celichowska

Poznań 2014

*Dziękuję Pani dr hab. Dorocie Bukowskiej, Panu Prof. Janowi  
Celichowskiemu oraz Pani dr Hannie Drzymale-Celichowskiej,  
za okazaną pomoc, życzliwość oraz cenne uwagi.*

*Dziękuję również rodzicom za wsparcie.*

# Spis treści

<b>1. Wykaz skrótów</b> .....	4
<b>2. Streszczenie</b> .....	5
<b>3. Summary</b> .....	8
<b>4. Wstęp</b> .....	11
4.1. Unerwienie i struktura mięśni szkieletowych .....	11
4.2. Przedziały mięśniowe.....	15
<b>5. Cel badań</b> .....	18
<b>6. Materiał i metody</b> .....	19
6.1. Materiał badawczy.....	19
6.2. Histochemiczne metody obrazowania .....	19
6.3. Pomiar sił skurczu .....	23
6.4. Analiza parametrów morfometrycznych .....	27
<b>7. Wyniki</b> .....	29
7.1. Parametry morfometryczne.....	29
7.2. Unerwienie motoryczne .....	35
7.3. Parametry skurczu.....	36
7.4. Parametry potencjałów czynnościowych .....	37
<b>8. Dyskusja</b> .....	44
8.1. Struktura przedziałów mięśniowych .....	44
8.2. Unerwienie motoryczne .....	46
8.3. Analizy zapisów sił skurczu .....	48
8.4. Znaczenie funkcjonalne .....	52
8.5. Ograniczenia metodyczne .....	54
<b>9. Podsumowanie i wnioski</b> .....	57
<b>10. Literatura</b> .....	58

## 1. Wykaz skrótów

<b>%DM</b>	procent długości mięśnia
<b>A</b>	amplituda potencjału czynnościowego
<b>I</b>	włókna mięśniowe wolno kurczące się, tlenowe (ang. slow-twitch oxidative, SO)
<b>IIA</b>	włókna mięśniowe szybko kurczące się, tlenowo-glikolityczne (ang. fast-twitch oxidative glycolytic, FOG)
<b>IIB</b>	włókna mięśniowe szybko kurczące się, glikolityczne (ang. fast-twitch glycolytic, FG)
<b>IIX</b>	włókna mięśniowe szybko kurczące się (pośrednie)
<b>B</b>	przedział mięśniowy bliższy
<b>ct</b>	czas trwania skurczu pojedynczego (ang. contraction time)
<b>D</b>	przedział mięśniowy dalszy
<b>FF</b>	jednostka ruchowa szybko kurcząca się, nieodporna na zmęczenie (ang. fast fatigable)
<b>FR</b>	jednostka ruchowa szybko kurcząca się, odporna na zmęczenie (ang. fast resistant)
<b>hrt</b>	czas połowicznej relaksacji w skurczu pojedynczym (ang. half relaxation time)
<b>L4, L5, L6</b>	4, 5, 6 segment lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego
<b>LWM</b>	liczba włókien mięśniowych
<b>MAX TET</b>	skurcz tężcowy zupełny (ang. maximum tetanus)
<b>SWM</b>	średnica włókien mięśniowych
<b>WM</b>	włókna mięśniowe
<b>M</b>	mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki (jako całość)
<b>PAS</b>	reakcja Schiffa służąca do wykrywania polisacharydów (ang. periodic acid Schiff)
<b>PP</b>	powierzchnia przedziału
<b>S</b>	jednostka ruchowa wolno kurcząca się, odporna na zmęczenie (ang. slow)
<b>t</b>	całkowity czas trwania potencjału czynnościowego
<b>t (z)</b>	czas między skrajnymi wychyleniami zapisu potencjału czynnościowego

## 2. Streszczenie

Przedziały mięśniowe to strukturalne i czynnościowe podjednostki mięśnia, unerwione przez jedną z gałązek odchodzących od głównej gałęzi nerwu zaopatrującego dany mięsień. Obecność przedziałów mięśniowych wykazano u wielu gatunków ssaków a każdy z nich zawiera charakterystyczną proporcję włókien mięśniowych różnych typów i cechuje się odmiennymi właściwościami biochemicznymi oraz morfometrycznymi.

Mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki szczura, składa się z dwóch przedziałów mięśniowych: bliższego (B) (zawierającego większą proporcję włókien wolno kurczących się) oraz dalszego (D) (zawierającego większą proporcję włókien szybko kurczących się), a unerwiony jest przez lędźwiowe segmenty rdzenia kręgowego. W literaturze nie ma zarówno informacji na temat szczegółowej analizy parametrów morfometrycznych włókien w poszczególnych przedziałach mięśniowych, jak i informacji dotyczącej unerwienia poszczególnych przedziałów mięśniowych przez korzenie lędźwiowe z różnych segmentów rdzenia kręgowego.

Badania przeprowadzono na 24 dorosłych samicach szczura rasy Wistar. Celem pracy było określenie parametrów morfometrycznych przedziałów oraz średnic i liczby włókien mięśniowych w nich zawartych na przekrojach poprzecznych z różnych poziomów, wzdłuż długiej osi mięśnia. Poziomy te odpowiadały 10, 25, 40, 75 i 90% długości mięśnia (10% w pobliżu kolana, 90% przy ścięgnię Achillesa). Ponadto zbadany został udział poszczególnych korzeni brzusznych nerwów rdzeniowych pochodzących z czwartego (L4), piątego (L5) oraz szóstego (L6) segmentu lędźwiowego rdzenia kręgowego w unerwieniu poszczególnych przedziałów badanego mięśnia oraz ich wpływ na siłę skurczu pojedynczego, jak i skurczu tężcowego zupełnego. W analizach

morfometrycznych, zastosowano metodę wyczerpania glikogenu z włókien jednego przedziału mięśniowego, a następnie reakcję histochemiczną PAS (periodic acid Schiff) mającą na celu uwidocznienie zawartego w skrawkach glikogenu. Do analizy struktury użyty został mikroskop Nikon podłączony do kamery Nikon DS-Fi1c oraz specjalistyczne oprogramowanie komputerowe NIS-Elements Basic Research.

W celu określenia udziału korzeni brzusznych L4, L5 i L6 w unerwieniu mięśnia jako całości, jak i jego przedziałów, wykorzystano metodę elektrofizjologiczną pomiaru siły skurczu pojedynczego oraz tężcowego zupełnego wywołanych pobudzeniem każdego z tych korzeni. Zastosowano warunki pełnego unerwienia mięśnia, jak i częściowego odnerwienia jednego z przedziałów, po przecięciu jednej z dwóch gałązek nerwu zaopatrującego mięsień.

Wyniki dotyczące parametrów morfometrycznych wskazały, iż w porównaniu z przedziałem dalszym, bliższy jest mniejszy, posiada jednak większą liczbę włókien mięśniowych o mniejszej średnicy. Ponadto w obu przedziałach średnica włókien mięśniowych stopniowo wzrastała wzdłuż długiej osi mięśnia od części bliższej do dalszej. Maksymalna liczba włókien mięśniowych w przedziale bliższym wynosiła średnio  $5521 \pm 240$  (na poziomie 25% długości mięśnia), a w dalszym  $5360 \pm 237$  (na poziomie 40% długości mięśnia). Średnie wartości średnic włókien mięśniowych w przedziale bliższym i dalszym wynosiły odpowiednio:  $45,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$  i  $55,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$ .

Analiza unerwienia badanego mięśnia wykazała zmienność osobniczą w odniesieniu do lokalizacji jądra ruchowego w poszczególnych segmentach rdzenia kręgowego u badanych samic. Wykazano trzy alternatywne wzory unerwienia przez korzenie brzuszne: L4 i L5 (25%), wyłączenie L5 (31%) lub L5 i L6 (44%).

Średnia wartość siły skurczu tężcowego całego mięśnia wynosiła  $6,37 \pm 0,53 \text{ N}$ , dla przedziału bliższego  $2,24 \pm 0,24 \text{ N}$ , a dla dalszego  $4,86 \pm 0,66 \text{ N}$ . Wyniki te wskazały, że proces sumowania sił skurczu włókien mięśniowych obu przedziałów jest nieliniowy, o

charakterze sumowania mniej niż liniowego, gdyż siła skurczu całego mięśnia była mniejsza średnio o ok. 11% aniżeli algebraiczna suma sił skurczów indywidualnie pobudzanych przedziałów. Podobne zależności stwierdzono w badaniach dotyczących sumowania sił skurczów pojedynczych.

Analizy amplitud potencjałów czynnościowych mięśnia, jak i jego przedziałów potwierdzają wyniki badań morfometrycznych. Stwierdzono mianowicie, że najwyższe amplitudy potencjałów czynnościowych wiązały się z pobudzeniem korzenia brzuszego L5. Amplitudy potencjałów czynnościowych wywołane w przedziale dalszym były znacząco wyższe w porównaniu z amplitudami otrzymanymi w wyniku pobudzenia przedziału bliższego. Wykazano również, że w bliższym przedziale korzenie brzuszne L4 i L5 wywoływały potencjały o zbliżonych amplitudach, co podkreśliło znaczący udział aksonów korzenia L4 w unerwieniu tego przedziału.

### 3. Summary

Muscle compartments are subvolumes of skeletal muscles which are innervated by primary nerve branches and they have been documented in several muscles in mammals. These muscular regions are innervated by unique sets of motoneurons, contain characteristic proportions of muscle fiber types and have various contractile and histochemical profiles. Rat medial gastrocnemius is composed of two subvolumes: the proximal compartment (containing predominantly fast-twitch oxidative fibers) and the distal compartment (with mainly fast-twitch glycolytic fibers). However, there is no available literature data concerning detailed analysis of muscle fiber morphometric parameters within muscle compartments as well as along the muscle. Moreover, there is a lack of data concerning the innervation of the muscle and its compartments from different ventral roots.

The aim of this study was to determine the structure of the two medial gastrocnemius compartments and morphometric parameters of their muscle fibers (diameter, number) at five levels along the muscle, i.e. at about 10, 25, 50, 75 and 90% of the muscle length (10% near to the knee, 90% near to the Achilles tendon). Moreover, in electrophysiological experiments, single twitch parameters and maximal tetanic forces, evoked by stimulation of L4, L5 and L6 ventral roots were measured, both in whole muscle and in any of its compartments. The study was performed on 24 adult female Wistar rats.

Two methods were applied. First, the glycogen depletion technique (based on stimulation of axons innervating the muscle fibers) was combined with a histochemical PAS reaction, which allows to visualize the glycogen in non-depleted muscle fibers on



the muscle cross sections. The Nikon DS-Fi1c Camera and NIS-Elements Basic Research software were used for analysis.

Second, the electrophysiological method, based on stimulation of the L4, L5 and L6 ventral roots was used. The evoked muscle fiber action potentials and contraction forces were recorded in these experiments. The contractile properties were measured in preparations with intact muscle innervation and, after cutting one of the medial gastrocnemius primary nerve branches, one of the muscle compartments, i.e. of proximal or distal compartment in each experiment were studied.

Histological results revealed differences in size and number of muscle fibers in proximal and distal compartments of the medial gastrocnemius. In comparison to the distal compartment, the proximal one is smaller in size, has smaller cross-section area but contains slightly higher number of muscle fibers which are smaller in diameter. Moreover, there was a tendency, visible within each of the two compartments, for an increase of the muscle fiber diameter along the muscle. The highest noted number of muscle fibers in proximal compartment was  $5,521 \pm 240$  (visible at 25% of the muscle length), whereas in distal one  $5,360 \pm 237$  (at 40% of the muscle length). The mean values of muscle fiber diameters in proximal and distal compartments were:  $45.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$  and  $55.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , respectively.

Taking into account the muscle innervation – the individual variability was observed in location of the motor nucleus within lumbar segments of the spinal cord of studied female rats. The three alternative patterns of the medial gastrocnemius motor innervation were observed: L4 and L5 (25%), only L5 (31%) or L5 and L6 (44%).

The maximal tetanic force for whole muscle was  $6.37 \pm 0.53 \text{ N}$ . The tetanic forces for the proximal and distal compartments were  $2.24 \pm 0.24 \text{ N}$  and  $4.86 \pm 0.66 \text{ N}$ , respectively. Therefore, the muscle force was approximately 11% lower than an algebraic sum of the forces of separately stimulated compartments. This observation

indicates that summation of forces produced by these two muscle compartments is nonlinear, with a less-than-linear effect. The same observation concerned the summation of twitch forces.

The analysis of action potentials of the muscle and its two compartments confirmed results obtained in the morphometric analysis, as the highest amplitudes of the potentials were observed during L5 ventral root stimulation. The amplitudes of action potentials evoked in the distal compartment were considerably higher in relation to the proximal one. In the proximal compartment, action potentials induced by stimulation of L4 and L5 ventral roots had similar amplitudes and this finding confirms the significant contribution of L4 axons in the innervation of this compartment.

## 4. Wstęp

### 4.1. Unerwienie i struktura mięśni szkieletowych

Mięśnie szkieletowe ssaków zbudowane są z włókien mięśniowych poprzecznie prążkowanych, które unerwiane są przez włókna nerwowe ruchowe, czuciowe, a także autonomiczne. Włókna autonomiczne towarzyszą naczyniom krwionośnym i kończą się w tkance łącznej mięśnia. Włókna ruchowe oraz czuciowe są składnikami nerwów czaszkowych oraz rdzeniowych, i unerwiają poszczególne włókna mięśniowe oraz receptory mięśniowe (Kandel 2000). Zakończenia włókien czuciowych znajdują się między innymi na włóknach mięśniowych intrafuzalnych (śródrzeczionowych) wchodzących w skład wrzecion mięśniowych. Stanowią one podstawowy element tego receptora czucia głębokiego, tworząc zakończenia pierwotne i wtórne (włókna typu Ia i II), reagujące na rozciąganie mięśnia (Hulliger 1984, Grottel i Krutki 1996). Włókna czuciowe typu Ib unerwiają receptory ścięgniste reagujące na skurcz włókien mięśniowych (Eccles i wsp. 1957, Grottel i Krutki 1996). Z kolei ruchowe zakończenia aksonów motoneuronów docierają do włókien mięśniowych ekstrakufuzalnych (zewnątrrzeczionowych) i wchodzi w skład synapsy nerwowo-mięśniowej (płytki ruchowej) (Cole 1947), w której wydzielana jest acetylocholina (Fatt 1950).

Włókna mięśni szkieletowych unerwiane są ruchowo przez trzy rodzaje motoneuronów: alfa, beta i gamma. Motoneurony alfa unerwiają wyłącznie włókna mięśniowe ekstrakufuzalne, stanowiące podstawową masę mięśnia. Motoneurony beta unerwiają włókna mięśniowe ekstra- i intrafuzalne, natomiast motoneurony gamma wyłącznie włókna mięśniowe intrafuzalne (Burke 1981, Grottel i Krutki 1996).

Akson jednego alfa motoneuronu po wnikięciu do mięśnia, rozgałęzia się i unerwia od kilkunastu do kilku tysięcy włókien mięśniowych. Taki układ nazywa się jednostką ruchową albo motoryczną (Sherrington, 1925), która jest najmniejszą, czynnościową strukturą układu nerwowo-mięśniowego. Występują 3 rodzaje jednostek ruchowych: szybko kurczące się, nieodporne na zmęczenie FF (*ang. fast fatigable*), szybko kurczące się, odporne na zmęczenie FR (*ang. fast resistant*) oraz wolno kurczące się, odporne na zmęczenie S (*ang. slow*). Jednostki szybko kurczące się charakteryzują większe siły skurczu aniżeli jednostki wolno kurczące się (Burke i wsp. 1973). Każde włókno mięśniowe unerwione jest przez jeden motoneuron, ale każdy z nich unerwia większą liczbę włókien mięśniowych. Im więcej włókien mięśniowych wchodzi w skład jednostki ruchowej, tym osiąga ona większą siłę. W obrębie jednego mięśnia wskaźnik unerwienia (który określa, jaka liczba włókien mięśniowych jest zaopatrywana przez pojedynczy motoneuron) jest bardzo zróżnicowany w zależności od typu jednostki ruchowej. Najwięcej włókien mięśniowych wchodzi w skład jednostek FF, najmniej włókien zawierają jednostki typu S (Burke i Tsairis 1973, Kanda i Hashizume 1992).

W zależności od spełnianych przez dany mięsień funkcji, liczba jego włókien unerwianych przez jeden motoneuron jest różna. Na przykład, w mięśniach grzbietu człowieka, wskaźnik unerwienia wynosi 100 – 450, natomiast w mięśniach biorących udział w precyzyjnych czynnościach, takich jak mięśnie zewnętrzne gałki ocznej czy mięśnie palców, motoneuron obsługuje zaledwie kilka włókien mięśniowych (Kandel 2000, Krysiak i wsp. 2001). Jako reguła, akson motoneuronu dzieli się na gałązki (kolaterale) i unerwia włókna mięśniowe w jednym mięśniu. Wyjątkiem są jednostki ruchowe mięśni glistowatych kota, gdzie aksony jednego motoneuronu mogą wnikać do dwóch różnych mięśni (Emonet-Dénand i wsp. 1970), co ogranicza autonomię w poruszaniu poszczególnymi palcami. Istnieją także pewne doniesienia, które wskazują, iż podobna organizacja występuje w niektórych mięśniach palców dłoni człowieka

(Keen i Fuglevand 2004, Reilly i wsp. 2004, Wings i Santello 2004). Ciała motoneuronów, których aksony przebiegające w nerwach docierają do poszczególnych mięśni, położone są w istocie szarej rdzenia kręgowego (blaszka IX Rexeda) i w pniu mózgu. W rdzeniu kręgowym zorganizowane są w jądrach ruchowych wzdłuż brzusznej części istoty szarej (w postaci słupów). Jądra te rozciągają się pomiędzy dwoma, trzema segmentami, a ich aksony wchodzi w skład dwóch, trzech sąsiednich korzeni brzusznych nerwów rdzeniowych (Romanes 1951, Burke i wsp. 1977, Donselaar i wsp. 1985, Hashizume i wsp. 1988). Zatem, jeden mięsień może być ruchowo unerwiony przez motoneurony, których aksony biegną w kilku korzeniach brzusznych. Przykładowo, mięsień zębaty przedni szczura unerwiony jest przez trzy korzenie nerwów (szyjny 6 - 8), przepona przez cztery (szyjny 3 - 6) (Laskowski i High 1989), z kolei mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki unerwiony jest przez dwa lędźwiowe korzenie nerwów: L4 i L5. U samców tego gatunku wykazano, że większa część mięśnia brzuchatego (70% włókien mięśniowych) zaopatrywana jest przez aksony przebiegające w brzuszny korzeniu L5 (Celichowski i Taborowska 2011). Stwierdzono także, iż 20-30% włókien całego mięśnia trójgłowego łydki (mięsień płaszczkowaty i brzuchaty) unerwione są przez brzuszny korzeń L4, podczas gdy pozostałe 70-80% włókien mięśniowych unerwiają aksony z korzenia L5 (Brown i wsp. 1976, Lowrie i wsp. 1985).

Całkowita liczba motoneuronów wchodzących w skład jądra ruchowego mięśnia brzuchatego przyśrodkowego u szczura wynosi średnio 134 (Hashizume i wsp. 1988) lub 122 (Vanden Noven i wsp. 1994). Mierzejewska-Krzyżowska i wsp. (2014) wykazali natomiast, iż liczba ta wynosi do 94 (u samców) i do 83 (u samic). U samców jądro ruchowe mięśnia zawiera średnio 66 alfa motoneuronów, natomiast u samic 56 (Mierzejewska-Krzyżowska i wsp. 2014).

Mięsień brzuchaty przyśrodkowy jest mięśniem szybkim, heterogenicznym (Grottel i Celichowski 1990, Celichowski i Drzymała 2006). W oparciu o metodę elektrofizjologiczną, polegającą na porównaniu siły skurczu mięśnia przy stymulacji nerwu ze średnią siłą skurczu jego jednostek ruchowych, oszacowano, iż w skład tego mięśnia u samców wchodzi około 57 jednostek ruchowych, natomiast u samic około 52 (Celichowski i Drzymała Celichowska 2007). W mięśniu tym występuje najwięcej jednostek ruchowych szybkich (FF i FR), a mniej wolnych (S). Istnieje natomiast wyraźna różnica międzypłciowa w odniesieniu do proporcji jednostek ruchowych. U samców występuje 51% jednostek FF, 37% FR i 12% S, a u samic odpowiednio: 38%, 36% i 26% (Celichowski i Drzymała Celichowska 2006). Średnie wartości wskaźnika unerwienia w przypadku samców oraz samic wynoszą odpowiednio 207 oraz 153 (Mierzejewska-Krzyżowska i wsp. 2011).

Wyraźne różnice w strukturze mięśnia między samicami i samcami wykazały także badania morfometryczne, w których dokonano pomiarów włókien mięśniowych w skrawkach z brzuszcowej części mięśnia. Wykazano, że u samców szczura mięsień brzuchaty składa się średnio z  $11636 \pm 1558$  włókien mięśniowych, a ich średnica wynosi  $57,99 \pm 6,41 \mu\text{m}$ , natomiast u samic liczba włókien mięśniowych wynosi  $7913 \pm 1570$ , a średnica  $50,85 \pm 4,89 \mu\text{m}$  (Mierzejewska-Krzyżowska i wsp. 2011).

Biorąc pod uwagę przemiany metaboliczne, w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym i innych mięśniach szkieletowych, wyróżnia się trzy podstawowe typy włókien mięśniowych: włókna szybkie glikolityczne (IIB), szybkie tlenowo-glikolityczne (IIA) oraz wolne tlenowe (I) (Stein i Padykula 1962, Brooke i Kaiser 1970). Ponadto wykazano także obecność włókien mięśniowych szybkich typu IIX o odporności na zmęczenie pośredniej pomiędzy włóknami IIB i IIA (Donoghue i wsp. 1991).

Mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki pod względem geometrii włókien mięśniowych jest mięśniem półpierzastym. Istnieją jednak pewne rozbieżności

literaturowe dotyczące jego struktury. U szczura włókna mięśniowe z długą osią mięśnia tworzą kąt  $19,4 \pm 1,5^{\circ}$ , a ich długość wynosi  $10,7 \pm 0,5$  mm (Zuurbier i Hujing 1992). Natomiast Gallo i wsp. (2004) podaje, że kąt pierzastości wynosi  $20,4 \pm 5,5^{\circ}$ , a długość włókien mięśniowych  $13,7 \pm 0,5$  mm (Ettema 1996).

#### **4.2. Przedziały mięśniowe**

Przedziały mięśniowe, zgodnie z definicją zaproponowaną przez English i Letbetter (1982a), to strukturalne i czynnościowe sektory, unerwione przez jedną z gałązek nerwowych odchodzącą od głównej gałęzi nerwu zaopatrującego dany mięsień i obsługiwane przez własną pulę motoneuronów. Każdy przedział mięśniowy złożony jest z odrębnej populacji jednostek ruchowych i zawiera różną proporcję poszczególnych typów włókien mięśniowych (English i Letbetter 1982b). Obecność przedziałów stwierdzono w licznych mięśniach ssaków. Na przykład u szczura: w mięśniu brzuchatym bocznym łydki (English i Weeks 1984), mostkowo-obojczykowo-sutkowym (Zenker i wsp. 1988), prostowniku długim palców (Balice-Gordon i Thompson 1988), brzuchatym przyśrodkowym łydki (Gardiner i wsp. 1991, Vanden Noven i wsp. 1994, De Ruitter i wsp. 1995a), przeponie (Pickering i Jones 2002); u kota: w mięśniu brzuchatym bocznym łydki (English i Letbetter 1982a), półścięgnistym (Bodine i wsp. 1982), dwugłowym uda (Chanaud i wsp. 1991); u królika: w żwaczu (English i wsp. 1999, Widmer i wsp. 2003); u psa: w mięśniu bródkowo-gnykowym (Mu i Sanders 1998), bródkowo-językowym (Mu i Sanders 2000); u konia: w mięśniu pierścienno-tarczowym (Reesink i wsp. 2013); u makaka jawańskiego: w mięśniu zginaczu łokciowym nadgarstaka (Pereira i wsp. 2004) i mięśniach zewnętrznych gałki ocznej (Peng i wsp. 2010, da Silva Costa i wsp. 2011). Wykazano, że przedziały obecne są także w mięśniach człowieka: dwugłowym ramienia (Segal 1992), pierścienno-nalewkowym tylnym

(Sanders i wsp. 1994), zwieraczu gardła (Mu i Sanders 2001), mięśniach zewnętrznych gałki ocznej (Peng i wsp. 2010, da Silva Costa i wsp. 2011), mięśniu skroniowym (Chang i wsp. 2013) oraz mięśniach kłębku i kłębiku dłoni (Xie i wsp. 2012).

Mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki szczura, będący materiałem badawczym w niniejszej rozprawie, posiada dwa przedziały: bliższy (głęboki region) oraz dalszy (powierzchniowy region) (Gardiner i wsp. 1991, Vanden Noven i wsp. 1994, De Ruiters i wsp. 1995a). Każdy z tych dwóch przedziałów unerwiony jest przez jedną z dwóch gałęzi nerwu dochodzącego do tego mięśnia. Nerw ten stanowi odgałęzienie nerwu piszczelowego, który to wraz z nerwem strzałkowym wchodzi w skład nerwu kulszowego. Obie gałązki unerwiające przedziały, zawierają aksony różnych typów motoneuronów (tj. oba przedziały mięśniowe tworzone są przez odrębne zespoły jednostek ruchowych), a poszczególne aksony nie oddają kolaterali do obu gałęzi jednocześnie (Pfeiffer i Friede, 1985).

Pod względem zawartości typów włókien mięśniowych bliższy przedział zawiera 10% włókien typu I, 10% typu IIA, 45% typu IIX oraz 35% typu IIB, podczas gdy dalszy 20% typu IIX i 80% typu IIB (De Ruiters i wsp. 1995b). Poza tym zaobserwowano, iż włókna mięśniowe typu IIX oraz IIB w bliższym przedziale, mają mniejsze średnice i wybarwiają się intensywniej przy wykrywaniu obecności dehydrogenazy bursztynianowej w porównaniu z tego samego typu włóknami w dalszym przedziale mięśnia (Lind i Kernell 1991, De Ruiters i wsp. 1995a).

Znaczna część badań dotyczących przedziałów mięśniowych dotyczyła zagadnienia formowania się ich w procesie ontogenezy. Wiadomym faktem jest, iż przedziały mięśniowe są już ustalone w momencie narodzin (Dennis i wsp. 1981, Donahue i English 1987, Balice-Gordon i Thompson 1988, Bennett i Ho 1988), a postnatalna eliminacja synaps nie odgrywa roli w kształtowaniu przedziałów. Zaobserwowano, że jednodniowy mięsień prostownik długi palców szczura zawiera



gałąź nerwu zaopatrującą włókna mięśniowe w tym samym przedziale co u dorosłych osobników (Balice-Gordon i Thompson 1988). Jednakże w obrębie samych przedziałów właściwa organizacja projekcji aksonów jest ostatecznie wyznaczona dopiero po postnatalnej synaptycznej reorganizacji motoneuronów (Bennett i Ho 1988). Wyniki badań Gatesy i English (1993) sugerują natomiast, że nowe synapsy tworzone na drugorzędowych miotubach w pierwszym postnatalnym tygodniu życia są w większości selektywne i specyficzne dla przedziałów, co może być bardzo istotną obserwacją dla wyjaśnienia procesów kształtowania się unerwienia mięśni.

Niektóre badania dowiodły, iż ustalanie przedziałów w rozwoju jest obarczone pewnym błędem, który jest następnie eliminowany. U noworodków szczura w mięśniu brzuchatym bocznym łydki zaobserwowano, iż niewielki procent włókien mięśniowych otrzymuje aksony nie tylko z jednej, właściwej dla danego przedziału gałęzi nerwu, ale z większej ich liczby. Rejon mięśnia z takim dodatkowym doprowadzeniem unerwienia (międzyprzedziałowym) nazywa się przedziałem przejściowym, który zanika w 8 dniu życia i nie występuje u dorosłych osobników (Gatesy i English 1993). Eliminacja synaps międzyprzedziałowych różni się od eliminacji tych, które zawarte są w obrębie jednego przedziału (wewnątrzprzedziałowych). Wewnątrzprzedziałowe synapsy ulegają atrofii w wolniejszym tempie w porównaniu z synapsami międzyprzedziałowymi (Donahue i English 1989).

## 5. Cel badań

Badania opisane w prezentowanej rozprawie dotyczą struktury oraz unerwienia przedziałów mięśni szkieletowych i przeprowadzone zostały na mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki szczura, który składa się z dwóch przedziałów mięśniowych. Celami szczegółowymi pracy są:

1. określenie wielkości przedziałów mięśniowych, a także średnic i liczby włókien mięśniowych w nich zawartych na podstawie analizy przekrojów poprzecznych mięśnia na różnych poziomach jego długości,
2. zbadanie struktury unerwienia motorycznego obu przedziałów mięśniowych przez aksony zawarte w brzusznych korzeniach L4, L5 oraz L6,
3. określenie udziału aksonów z brzusznych korzeni L4, L5 oraz L6 w unerwieniu mięśnia jako całości, jak i jego obu przedziałów, poprzez pomiar sił skurczu pojedynczego oraz tężcowego zupełnego.

Dane literaturowe wskazują, iż oba przedziały różnią się w swym składzie, jednak nie zawierają żadnych informacji w odniesieniu do struktury przedziałów, jak i parametrów morfometrycznych ich włókien mięśniowych wzdłuż całej długości mięśnia. Ponadto całkowicie nieznaną jest rozkład unerwienia motorycznego z brzusznych korzeni lędźwiowych w obu przedziałach, a zarazem zróżnicowany wpływ aksonów z różnych segmentów rdzenia kręgowego na siłę skurczu w przedziałach mięśniowych.

## 6. Materiał i metody

### 6.1. Materiał badawczy

Badania przeprowadzone zostały na samicach szczura rasy Wistar (24 osobniki) w wieku około 4 miesięcy, pochodzących z tej samej hodowli (Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu). Średnia masa ciała zwierząt wynosiła  $224 \pm 4,5$  g (200-290 g). Wszystkie zwierzęta utrzymywano w jednakowych warunkach, w pomieszczeniu o 12-godzinnym odwróconym cyklu oświetlenia i stałej temperaturze  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  z dostępem do wody i paszy („Labofeed B” Kcynia) *ad libitum*. Warunki w jakich przebywały zwierzęta były zgodne z wymogami prawa polskiego i Unii Europejskiej. Na wykonanie doświadczeń Uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej.

W czasie trwania doświadczenia zwierzęta utrzymywano w głębokiej narkozie pentobarbitalowej (Morbital, pierwsza dawka 60 mg/kg dootrzewnowo, uzupełniana w razie konieczności dawkami 10 mg/kg). Głębokość znieczulenia była kontrolowana za pomocą odruchów cofania kończyn. Po zakończeniu doświadczenia zwierzętom aplikowano letalną dawkę Morbitalu (180 mg/kg), a następnie izolowano, ważono oraz mierzono długość badanego mięśnia.

### 6.2. Histochemiczne metody obrazowania

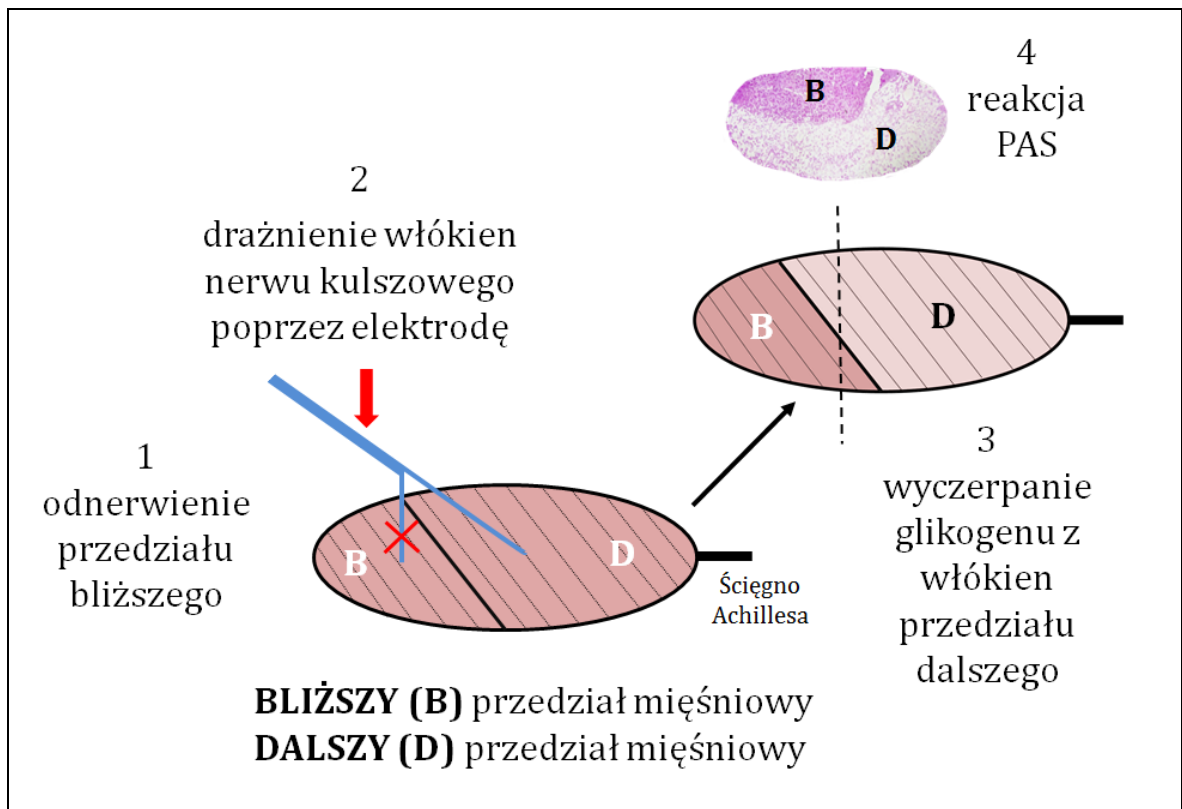
W celu określenia parametrów morfometrycznych zastosowano metodę wyczerpania glikogenu z włókien jednego przedziału mięśniowego, a następnie reakcję histochemiczną PAS mającą na celu uwidocznienie zawartego w nich glikogenu (ryc. 1). Metoda wyczerpania glikogenu polega na powtarzanym drażnieniu aksonów

motoneuronów impulsami elektrycznymi, przy jednoczesnym pozbawieniu dopływu krwi do mięśnia szkieletowego. Aby zwizualizować glikogen we włóknach mięśniowych po etapie drażnienia odgałęzień nerwu, zastosowano reakcję PAS. Technika wyczerpania glikogenu jest metodą standardową, wielokrotnie wykorzystywaną w wielu doświadczeniach, mających na celu precyzyjne znakowanie włókien mięśni szkieletowych (Tötösy de Zepetnek i wsp. 1992, Rafuse i Gordon 1996).

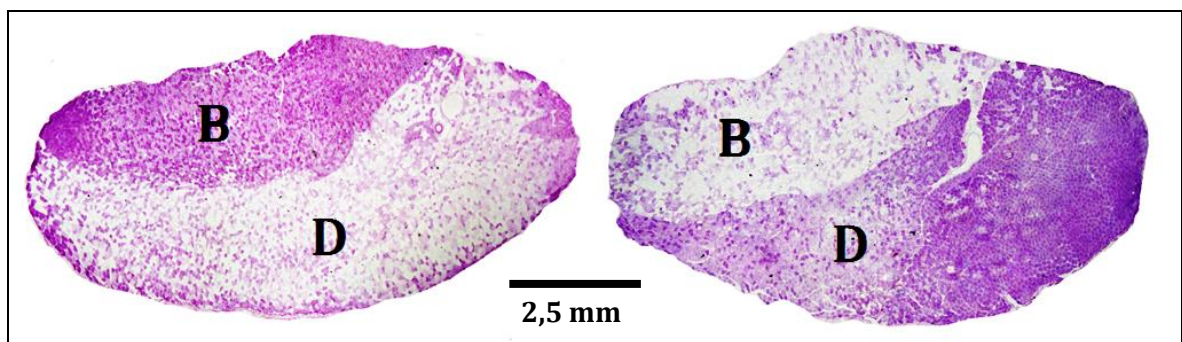
Preparatykę rozpoczynano od częściowego izolowania mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki oraz unerwiającej go gałęzi nerwu kulszowego (nerwu piszczelowego). Pozostałe odgałęzienia nerwu kulszowego przecinano, odnerwiając sąsiednie mięśnie. Następnie przecinano gałązkę bliższą badanego mięśnia, a pod nerwem kulszowym umieszczano dwubiegunową elektrodę. Nerw drażniono przez 50 min ciągami pobudzeń o częstotliwości 40 Hz i czasie trwania 325 ms. Drażnienie przebiegało 25 min z dopływem krwi i 25 min bez jej dopływu, po skoagulowaniu naczynia żylnego wnikaącego do mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki od strony dołu podkolanowego (De Ruiten i wsp. 1995a). Procedura ta prowadziła do wyczerpania glikogenu z włókien przedziału dalszego (nieodnerwionego, n = 6). Zastosowano również wariant doświadczenia, w którym przecinano gałązkę dalszą wnikaącą do badanego mięśnia oraz wyczerpywano glikogen z włókien przedziału bliższego (ryc. 2). Przedział ten zawiera więcej włókien wolno kurczących się, dlatego w tym przypadku wydłużano czas drażnienia nerwu kulszowego do 90 min (n = 2) (De Ruiten i wsp. 1995a).

Bezpośrednio po zakończonym procesie wyczerpania glikogenu, mięsień pobierano i mrożono w izopentanie (2-metylobutanie) o temperaturze  $-160^{\circ}\text{C}$  (po uprzednim schłodzeniu w ciekłym azocie) przez 30 sek. Następnie zmrożone próbki przenoszono do kriostatu (o temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ ) i ścinano na skrawki o grubości 10  $\mu\text{m}$ . Otrzymane skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych i poddawano reakcji

PAS w celu wykrycia glikogenu we włóknach mięśniowych (Pearse 1961, z niewielkimi modyfikacjami). Preparaty osuszano, a następnie przez 7 min utrwalano w płynie Carnoya (alkohol etylowy, chloroform i kwas octowy), płukano wodą destylowaną, przez 10 min poddawano działaniu 0,5% kwasu nadjodowego, ponownie płukano wodą destylowaną i przez 30 min inkubowano w odczynniku Schiff'a (w zaciemnieniu). Po tym czasie preparaty umieszczano na 6 min w 0,5% roztworze pirosiarczynu sodu, dalej przez 15 min płukano w bieżącej wodzie i na końcu preparaty przepłukiwano wodą destylowaną. Reakcja PAS polega na utlenieniu substratu zawartego w tkankach za pomocą kwasu nadjodowego. Dochodziło w niej do utlenienia zawartych w glikogenie grup 1,2-glikolowych do aldehydów, które następnie wykrywane w skrawkach mięśniowych za pomocą odczynnika Schiffa (nasycony tlenkiem siarki (IV), bezbarwny lub bladożółty roztwór wodny fuksyny). Kolejnym etapem było odwodnienie preparatów w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu: 50, 70, 80 i 96% przez 2 min oraz 100% przez 8 min. Ostatecznie próby poddano prześwietleniu w ksylenie (10 min) i zatapiano w medium zamykającym („DPX mountant” firmy BDH). Obrazowania gotowych preparatów histologicznych dokonano za pomocą mikroskopu świetlnego Nikon podłączonego do kamery Nikon DS-Fi1c oraz specjalistycznego oprogramowania komputerowego NIS-Elements Basic Research.



**Rycina 1.** Schemat metody histochemicznej.



**Rycina 2.** Fotografie przekrojów poprzecznych skrawków (40% długości mięśnia) otrzymanych w dwóch typach postępowania: wyczerpanie glikogenu z włókien przedziału dalszego (D – po lewej) lub z przedziału bliższego (B – po prawej).

### 6.3. Pomiary sił skurczu

Metoda elektrofizjologiczna drażnienia brzusznych korzeni lędźwiowych L4-L6 (Hashizume i wsp. 1988, Celichowski i Drzymała-Celichowska 2007) wykorzystana została w celu określenia wzorców unerwienia mięśnia i jego przedziałów oraz pomiaru sił skurczu. Schemat podstawowej aparatury i połączeń stosowanych w czasie badań elektrofizjologicznych przedstawiono na rycinie 3.

Początkowo nacinano skórę w okolicy pachwiny, a następnie izolowano i przecinano pień nerwu udowego w celu odnerwienia mięśni kończyny tylnej zaopatrywanych przez ten nerw. Dalej w lewej kończynie częściowo izolowano mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki oraz unerwiającą go gałąź nerwu kulszowego (nerw piszczelowy). Pozostałe gałęzie nerwu kulszowego przecinano, odnerwiając sąsiednie mięśnie. W odcinku lędźwiowym kręgosłupa wykonywano laminektomię: usuwano mięśnie przykręgosłupowe oraz wyrostki kolczyste i łuki kręgów, odsłaniając rdzeń kręgowy. Po zdjęciu opony twardej przecinano rdzeń kręgowy na wysokości kręgu L1, po czym izolowano korzenie grzbietowe i brzuszne nerwów rdzeniowych segmentów L4, L5 oraz L6. Szczura umieszczano w metalowej ramce, do której przywiązywano krawędzie przeciętej skóry grzbietu, tworząc zagłębienie na olej parafinowy, który pokrywał rdzeń kręgowy i korzenie nerwów rdzeniowych. Następnie zwierzę unieruchamiano na stanowisku pomiarowym za pomocą metalowych uchwytów przymocowanych do kości goleni oraz do wyrostków kolczystych 13 kręgu piersiowego oraz 2 krzyżowego. Kończynę umieszczano w metalowym pojemniku i po jej unieruchomieniu (poprzez uchwyt na kościach goleni), zapewniającym warunki izometryczne skurczu, odsłonięty mięsień i nerw kulszowy zalewano olejem parafinowym. Temperatura oleju i ciała zwierzęcia była utrzymywana na stałym poziomie ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) przez cały czas trwania doświadczenia za pomocą

automatycznego termoregulatora. Badany mięsień od strony ścięgna Achillesa podłączano do izometrycznego przetwornika siły (typu FT 510, zakres pomiarowy 0 – 10 N, o odkształceniu elementu pomiarowego 100  $\mu\text{m}/1\text{ N}$ ). Dodatkowo do mięśnia wkłuwano dwubiegunową elektrodę odbiorczą, wykonaną z dwóch srebrnych drutów o średnicy 0,5 mm, umieszczanych prostopadle do włókien mięśniowych w środkowej części brzuśca mięśnia (w odległości 5 mm od siebie), w celu rejestracji potencjałów czynnościowych. Potencjały te wzmacniane były przy użyciu wzmacniacza prądu zmiennego (ISO DAM 8A). W oleju parafinowym wypełniającym zagłębienie na grzbiecie zwierzęcia zanurzano metalową płytkę, na której umieszczano korzenie brzuszne nerwów rdzeniowych segmentów L4, L5 i L6. Następnie do zagłębienia na grzbiecie wlewano roztwór soli fizjologicznej (0,9% roztwór NaCl), tworzący pod warstwą oleju parafinowego drugą warstwę cieczy. Elektrode drażniącą umieszczano w taki sposób, aby w warstwie soli fizjologicznej znajdowała się katoda, a w warstwie oleju anoda, na którą nakładano wcześniej odpowiedni korzeń brzuszny. Poszczególne korzenie brzuszne drażniono elektrycznymi impulsami prostokątnymi o amplitudzie 0,5 V i czasie trwania 0,1 ms, generowanymi przez stymulator Grass S-88. Dokonywano pomiaru siły skurczu tężcowego zupełnego, najpierw całego mięśnia (drażnienie ciągiem pobudzeń o częstotliwości 150 Hz i czasie trwania 250 ms), po nałożeniu na elektrodę kolejno korzeni brzusznych L4, L5 i L6 (ryc. 4.1), a następnie po przecięciu jednej z dwóch gałęzek unerwiających mięsień, mierzono siłę skurczu jednego z dwóch przedziałów (nieodnerwionego) (ryc. 4.2). Zatem w jednym doświadczeniu można było dokonać pomiarów sił całego mięśnia oraz przedziału bliższego ( $n = 8$ ) lub przedziału dalszego ( $n = 8$ ).

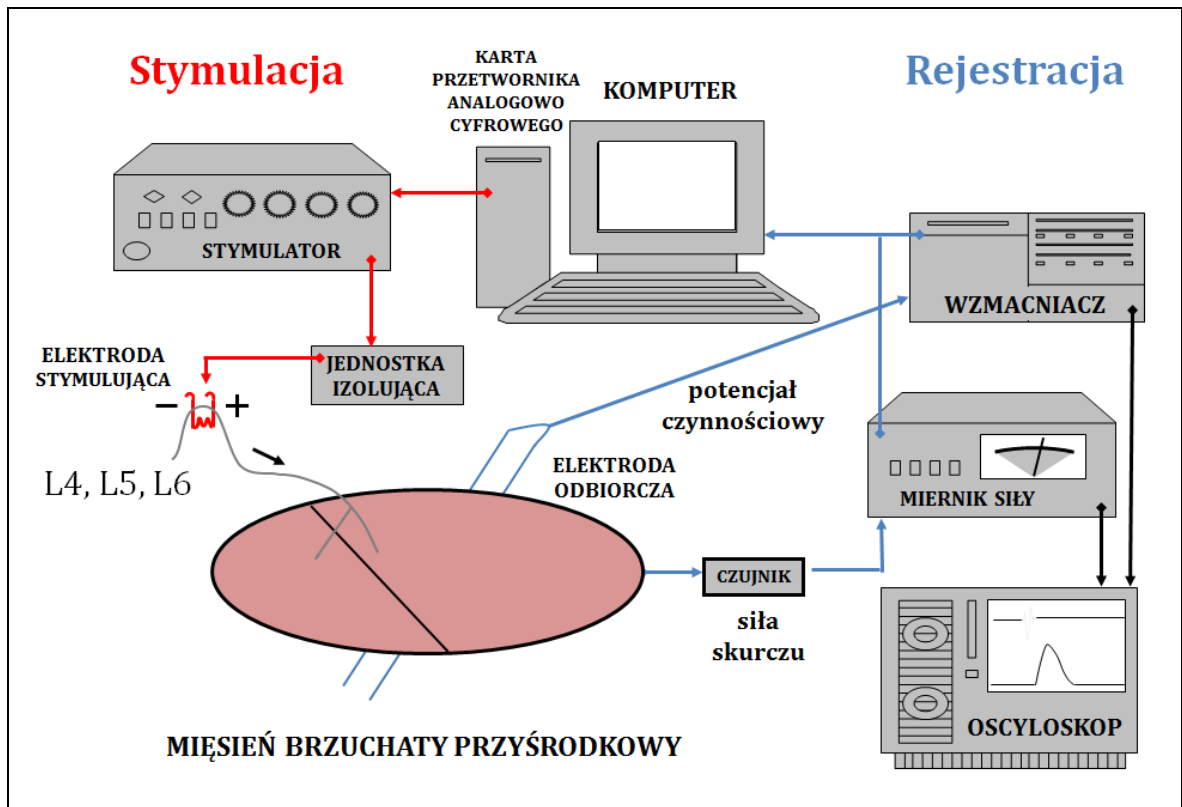
Siłę skurczu tężcowego zupełnego określano mierząc jego siłę do maksymalnego wychylenia zapisu. Siłę skurczu pojedynczego określano mierząc jego siłę do szczytu wychylenia zapisu, czas skurczu mierzono od początku do szczytu zapisu, a czas



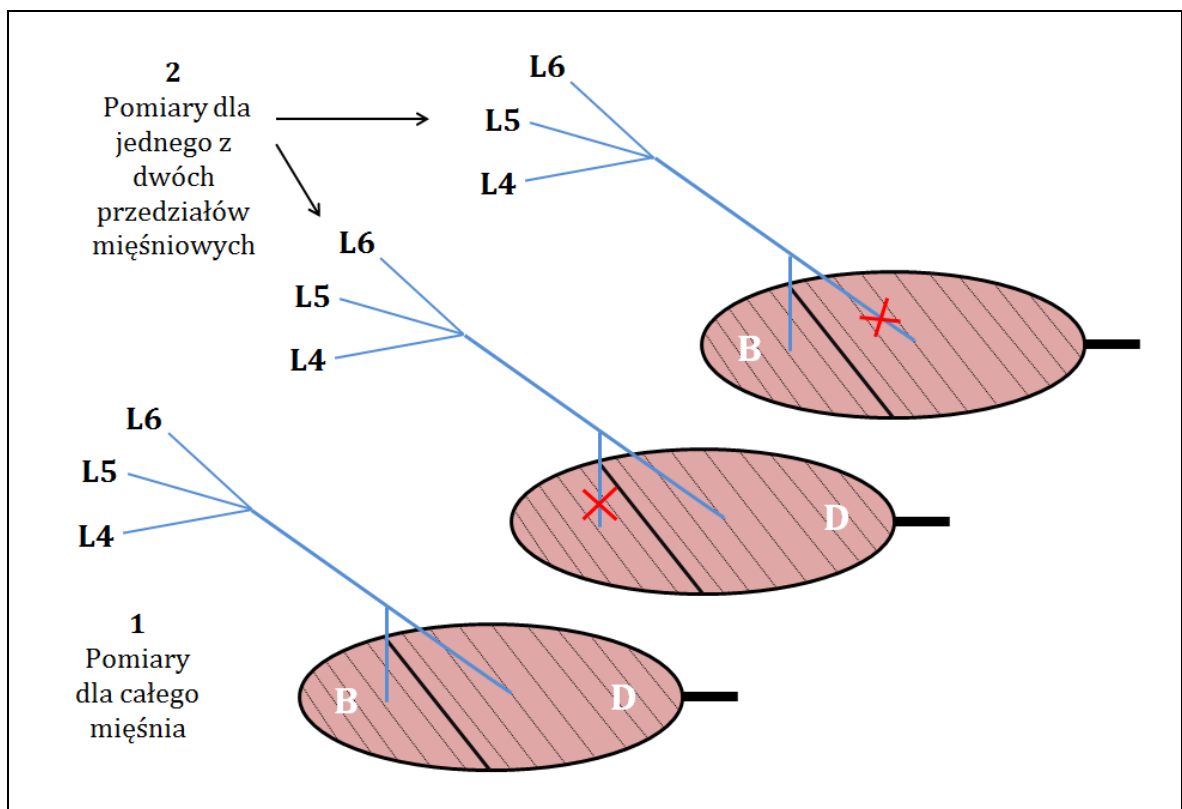
połowicznej relaksacji od szczytu zapisu do momentu spadku siły o połowę jej wartości. Natomiast w przypadku potencjałów czynnościowych, określano ich czasy trwania, czas między skrajnymi wychyleniami zapisu, jak również amplitudę (także między skrajnymi wychyleniami).

Zapisy siły skurczu tężcowego zupełnego, pojedynczego oraz potencjałów czynnościowych mięśnia (amplitudy i czasy trwania) wywoływane podczas drażnienia korzeni nerwów rdzeniowych rejestrowane i analizowane były przy użyciu przetwornika analogowo-cyfrowego (Advantech USB-4716, Portable Data Acquisition Module) oraz programu komputerowego Analog 2010.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz błąd standardowy.



**Rycynina 3.** Schemat podstawowej aparatury stosowanej w czasie badań elektrofizjologicznych.

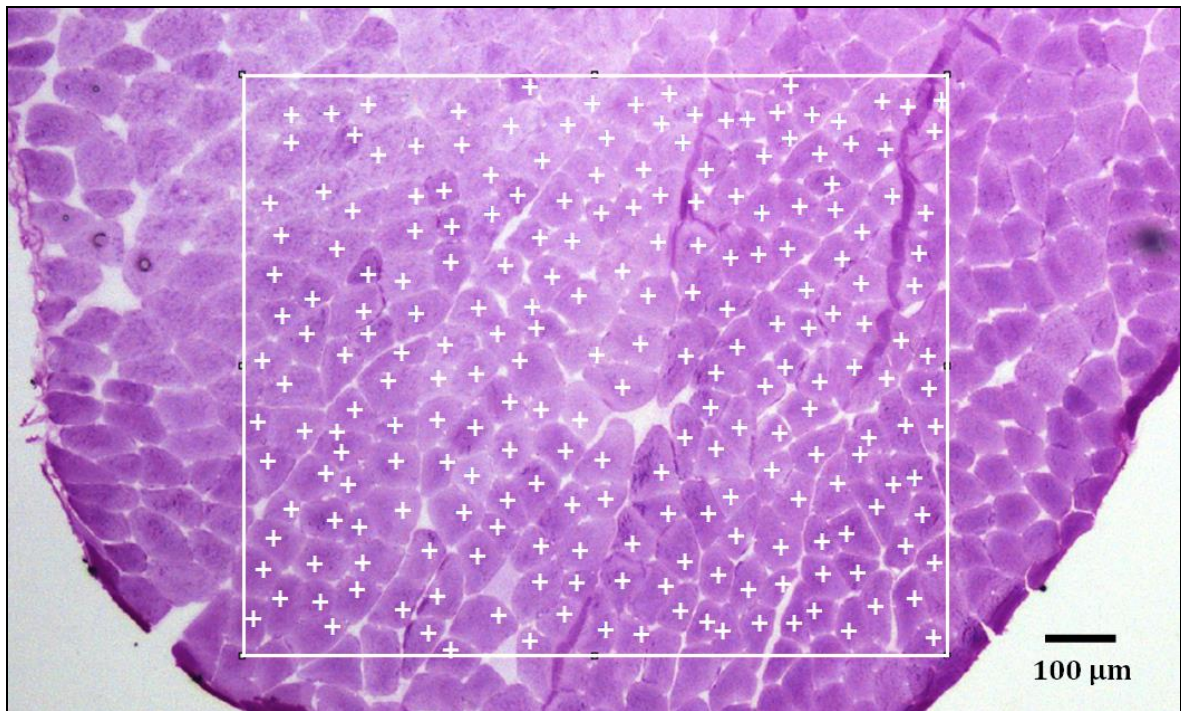


**Rycynina 4.** Schemat dwóch wariantów doświadczalnych przy badaniu parametrów skurczu mięśnia i jego przedziałów. B – przedział bliższy, D – przedział dalszy.

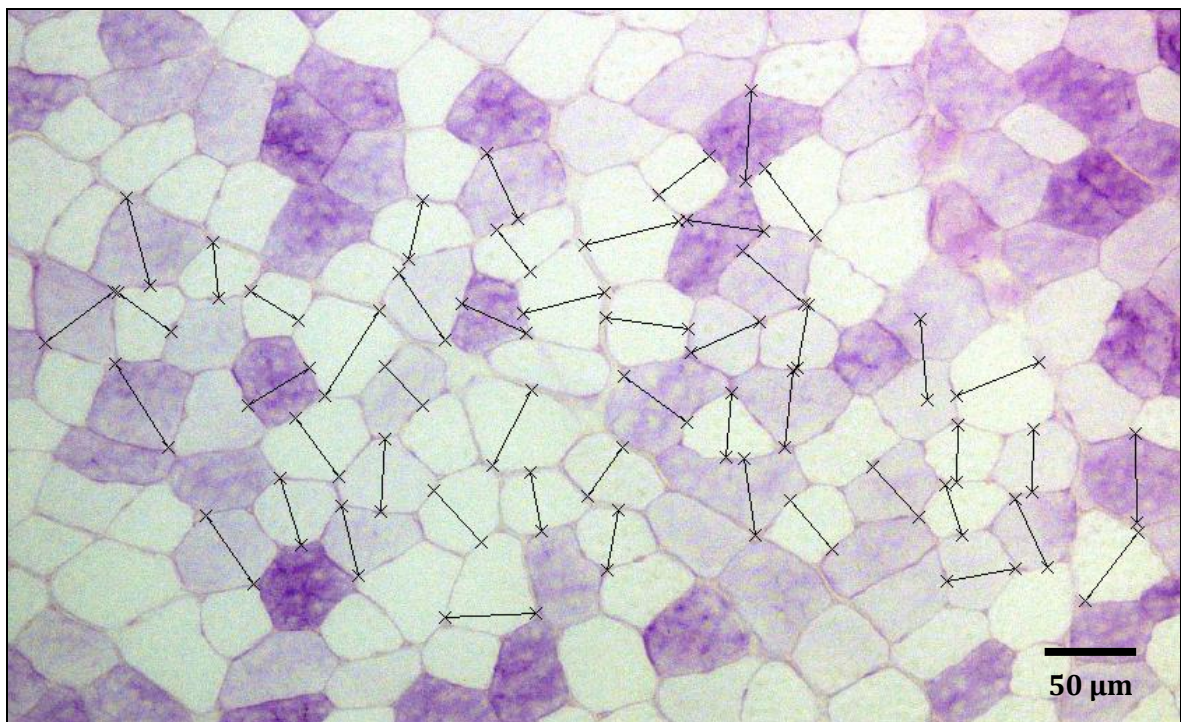
#### 6.4. Analiza parametrów morfometrycznych

Badanie struktury przedziałów zawierało: pomiar powierzchni przedziałów oraz liczby i średnicy włókien mięśniowych ze skrawków pobranych na pięciu różnych poziomach wzdłuż długiej osi mięśnia, odpowiadających 10, 25, 40, 75 i 90% długości mięśnia (10% w pobliżu kolana, 90% przy ścięgnię Achillesa). Procent długości mięśnia określano na podstawie całkowitej długości mięśnia, którą mierzono zaraz po izolacji. Do analiz wybrano przekrój na poziomie 40% długości mięśnia, ponieważ w tym miejscu mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki ma największe pole przekroju poprzecznego. Liczbę włókien mięśniowych na przekrojach poprzecznych skrawków szacowano na podstawie średniej gęstości tych włókien w 3 pomiarach (3 obszary po 1 mm<sup>2</sup>) przypadających na 10 mm<sup>2</sup> pola przekroju skrawka (ryc. 5). Natomiast średnicę włókien mięśniowych szacowano na podstawie pomiarów średnic 50 włókien z 5 obszarów przypadających na 10 mm<sup>2</sup> pola przekroju skrawka. Ze względu na możliwość skośnego skrojenia fragmentów mięśnia (mięsień półpierzasty), brano pod uwagę krótszą średnicę (ryc. 6) (Dubowitz 1985, Mierzejewska-Krzyżowska 2011). Liczby obszarów pomiarowych dobierana była proporcjonalnie do wielkości skrawka. Na podstawie wyników pomiarów pola przekroju mięśnia (przedziału) szacowano liczbę jego włókien mnożąc powierzchnię pola przez średnią gęstość włókien mięśniowych przypadających na jednostkę powierzchni. Tę procedurę powtarzano dla każdego badanego poziomu długości mięśnia. Pomiaru pola powierzchni przekrojów skrawków dokonywano z zastosowaniem obiektywu 1x (3,82 μm/piksel), średnicy włókien obiektywu 10x (0,38 μm/piksel), natomiast liczenie włókien odbywało się przy użyciu obiektywu 4x (0,98 μm/piksel).

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz błęd standardowy.



**Rycina 5.** Wyznaczanie liczby włókien mięśniowych w polach o powierzchni 1 mm<sup>2</sup> (obiektyw 4x). Krzyżyki wskazują poszczególne włókna mięśniowe, które były automatycznie zliczane przez program komputerowy.



**Rycina 6.** Pomiar średnicy włókien mięśniowych (obiektyw 10x). Kreski wskazują średnice poszczególnych włókien.

## 7. Wyniki

Średnia masa mięśnia wynosiła  $0,75 \pm 0,07$  g (0,65 – 0,92 g), a jego długość  $25,4 \pm 1,2$  mm (24 – 27 mm). Stosunek masy mięśniowej do masy ciała wynosił  $0,31 \pm 0,02\%$  (0,27 – 0,35%).

### 7.1. Parametry morfometryczne

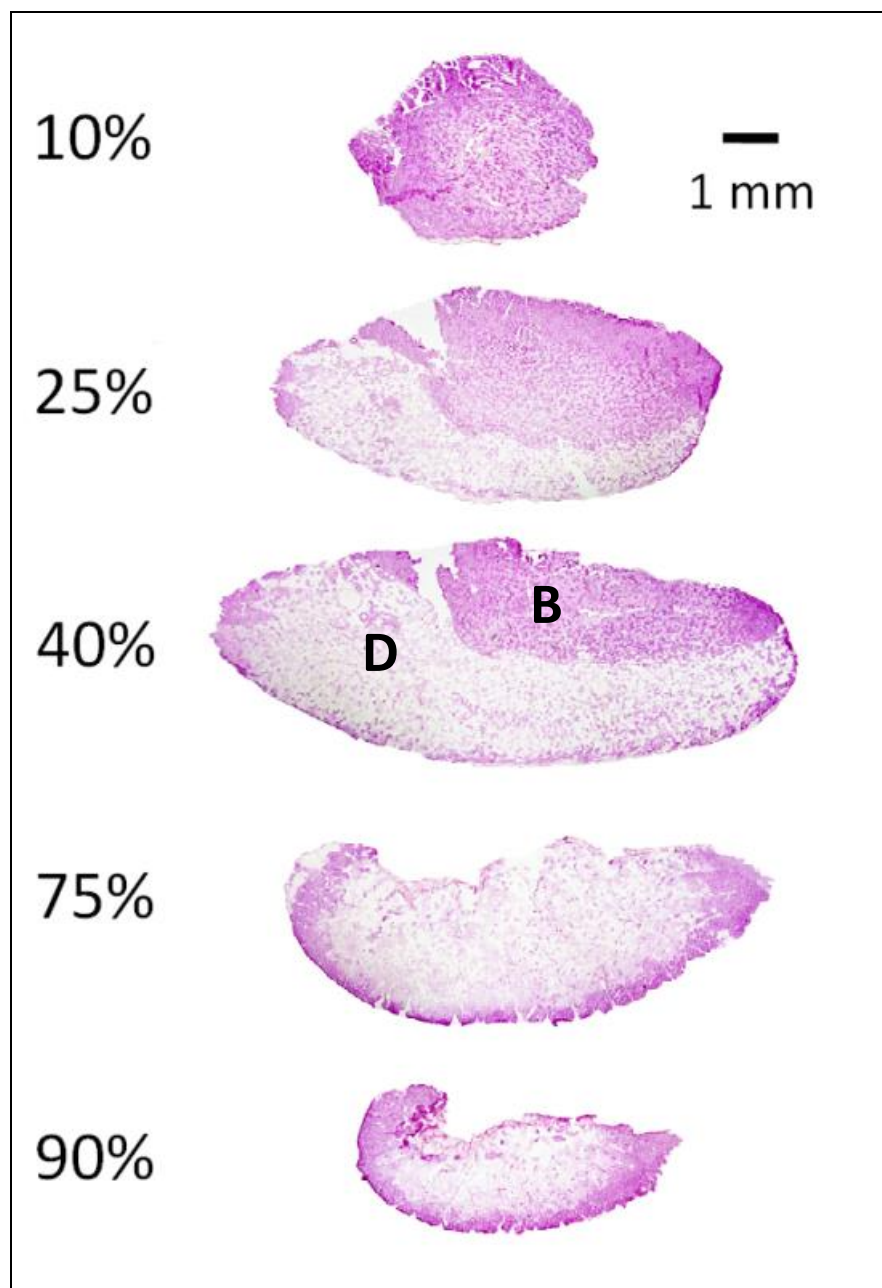
Wyniki wskazały, iż najmniejsze skrawki uzyskane ze skrajnych przekrojów długości mięśnia, to jest 10% (blisko kolana) oraz 75 i 90% (blisko ścięgna Achillesa), składają się tylko z jednego przedziału, odpowiednio bliższego i dalszego (ryc. 7, 8a). W skrawkach o największej powierzchni (ok. 40% długości mięśnia) przedział bliższy zajmował średnio  $31,9 \pm 1,3\%$  (26,9-38,0%) powierzchni skrawka. Maksymalne pole powierzchni przedziału bliższego wynosiło średnio  $13,5 \pm 0,4$  mm<sup>2</sup> (11,5 - 14,6 mm<sup>2</sup>, na poziomie 25% długości mięśnia), natomiast dalszego  $20,4 \pm 0,9$  mm<sup>2</sup> (16,8 - 25,6 mm<sup>2</sup>, na poziomie 40% długości mięśnia) (tab. 1, ryc. 8a).

Maksymalna liczba włókien mięśniowych zaobserwowana w przedziale bliższym wynosiła średnio  $5521 \pm 240$  (4536–6698, na poziomie 25% długości mięśnia), a w dalszym  $5360 \pm 237$  (4773-6603, na poziomie 40% długości mięśnia) – tab. 1, ryc. 8b). W przedziale bliższym stwierdzono zarazem większą gęstość komórkową: średnia liczba (ze wszystkich badanych poziomów) włókien mięśniowych przypadająca na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni skrawka dla przedziału bliższego wynosiła  $390 \pm 19$  (271 – 453), natomiast dla dalszego  $235 \pm 10$  (182 – 278).

Średnie wartości (ze wszystkich badanych poziomów) średnic włókien mięśniowych w przedziale bliższym i dalszym wynosiły odpowiednio:  $45,6 \pm 1,2$  μm

(39,3–54,3  $\mu\text{m}$ ) i  $55,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$  (44,5–64,5  $\mu\text{m}$ ) (ryc. 9). Zaobserwowano również, że średnica włókien mięśniowych stopniowo wzrasta od części bliższej do dalszej w obu przedziałach mięśniowych (tab.1, ryc. 8c).



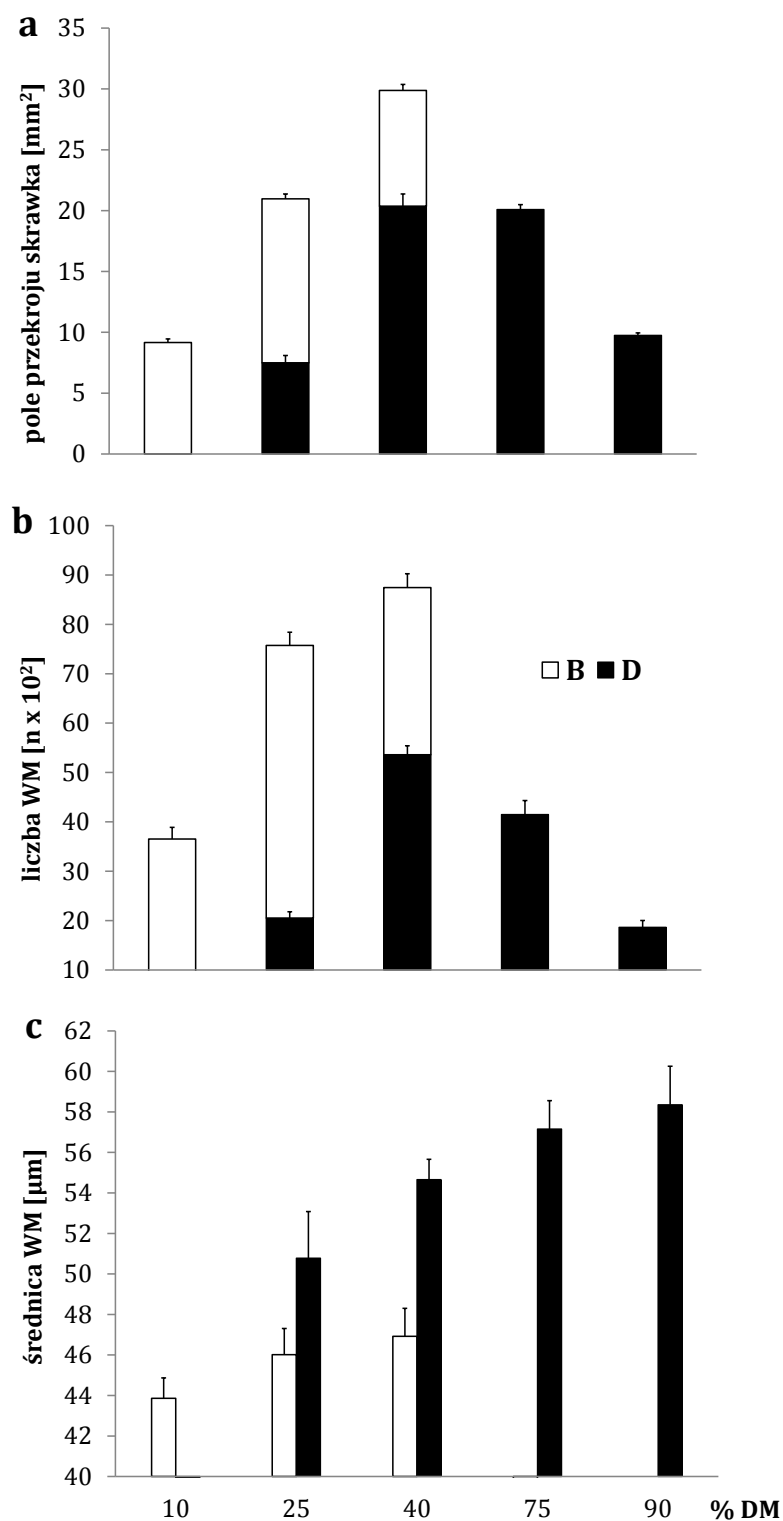


**Rycina 7.** Fotografie mikroskopowe skrawków pobranych z różnych poziomów wzdłuż długiej osi mięśnia (10% w pobliżu kolana, 90% przy ścięgnię Achillesa). Widoczne wyczerpanie glikogenu z włókien przedziału dalszego (D). Włókna przedziału bliższego (B) zajmują całe pole przekroju skrawka na poziomie 10% i coraz mniejsze pola na poziomach 25 i 40%.

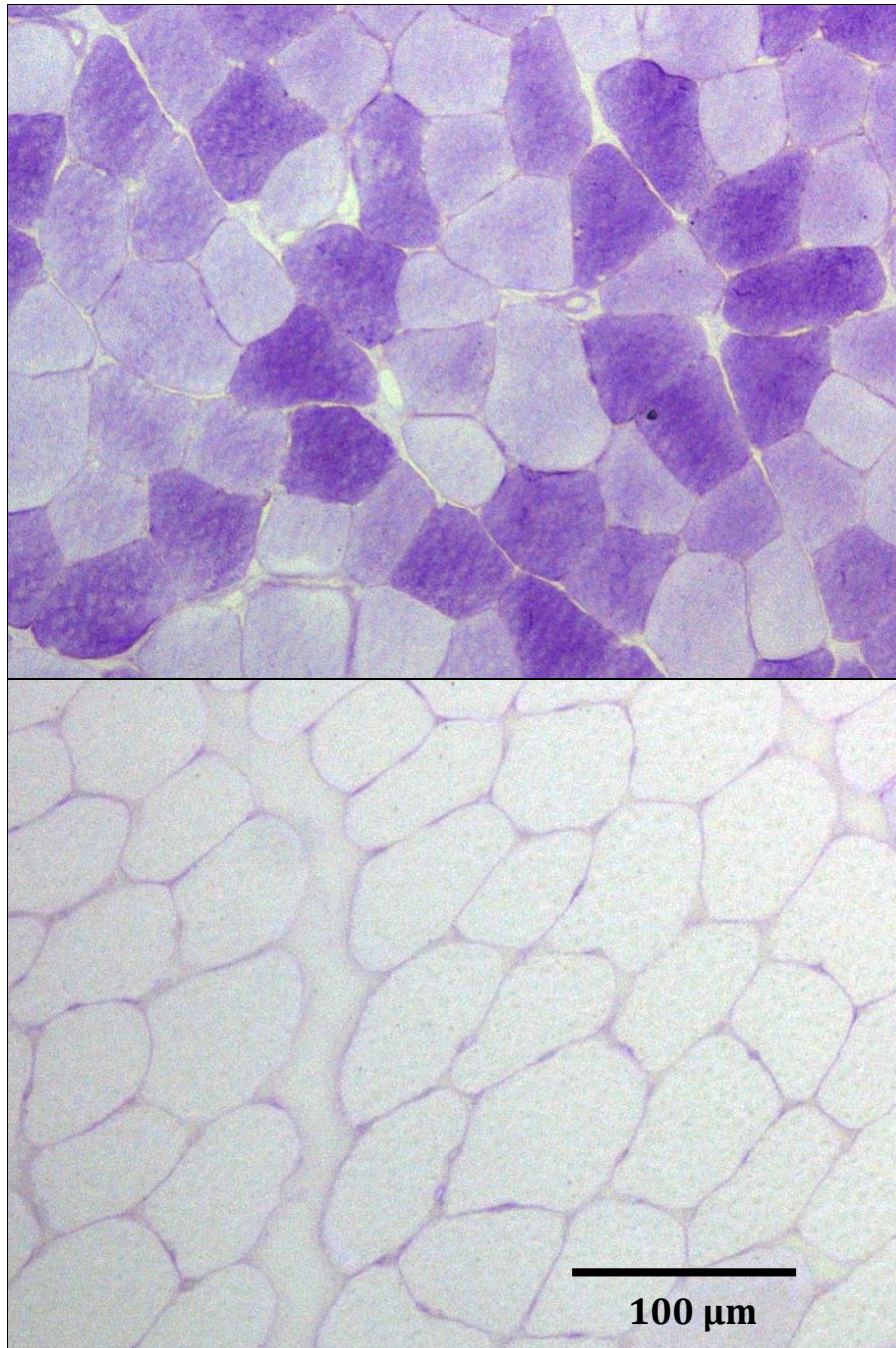
**Tabela 1.** Średnie  $\pm$  błąd standardowy (szare wiersze) i zakresy wartości (białe wiersze) parametrów morfometrycznych włókien mięśniowych przedziału bliższego (B) i dalszego (D). PP – powierzchnia przedziału, LWM – liczba włókien mięśniowych, SWM – średnica włókien mięśniowych, %DM – procent długości mięśnia.

% DM	PP [mm <sup>2</sup> ]			LWM			SWM [ $\mu$ m]	
	B	D	B+D	B	D	B+D	B	D
<b>10</b>	9,2 $\pm$ 0,3	\	9,2 $\pm$ 0,3	3653 $\pm$ 209	\	3653 $\pm$ 209	43,9 $\pm$ 1,0	\
	8,2 - 10,3	\	8,2 - 10,3	2445 - 4535	\	2445 - 4535	39,9 - 48,4	\
<b>25</b>	13,5 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 0,6	21,0 $\pm$ 0,7	5521 $\pm$ 240	2051 $\pm$ 172	7573 $\pm$ 216	46,0 $\pm$ 1,3	50,8 $\pm$ 2,1
	11,5 - 14,7	4,8 - 10,0	19,1 - 24,7	4536 - 6698	1488 - 2977	6632 - 8674	42,4 - 53,1	44,5 - 61,5
<b>40</b>	9,5 $\pm$ 0,5	20,4 $\pm$ 1,0	29,9 $\pm$ 1,1	3385 $\pm$ 251	5360 $\pm$ 237	8747 $\pm$ 396	46,9 $\pm$ 1,4	54,7 $\pm$ 0,9
	7,5 - 11,0	16,8 - 25,6	27,1 - 35,8	2280 - 4279	4773 - 6603	7234 - 10442	42,4 - 54,3	51,1 - 58,1
<b>75</b>	\	20,1 $\pm$ 0,4	20,1 $\pm$ 0,4	\	4148 $\pm$ 254	4149 $\pm$ 254	\	57,2 $\pm$ 1,3
	\	17,7 - 22,9	17,7 - 22,9	\	3328 - 5379	3329 - 5379	\	50,6 - 62,3
<b>90</b>	\	9,8 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,2	\	1865 $\pm$ 125	1866 $\pm$ 125	\	58,4 $\pm$ 1,6
	\	8,6 - 11,5	8,6 - 11,5	\	1291 - 2351	1292 - 2351	\	51,1 - 64,5





**Rycina 8.** Średnie wartości morfometryczne włókien mięśniowych w przedziałach. a – pole przekroju skrawków, b – liczba włókien mięśniowych, c – średnica włókien mięśniowych, B – przedział bliższy, D – przedział dalszy, WM – włókna mięśniowe, %DM – procent długości mięśnia; kreski wskazują wartości błędu standardowego.



**Rycina 9.** Fotografie mikroskopowe (obiektyw 10x) skrawków na poziomie 40% długości mięśnia: u góry przedział bliższy, na dole przedział dalszy (wyczerpany z glikogenu).

## 7.2. Unerwienie motoryczne

Doświadczenia elektrofizjologiczne wykazały, że drażnienie wyizolowanych korzeni brzusznych nerwów rdzeniowych L4, L5 i L6 skutkowało wywołaniem skurczów i potencjałów czynnościowych w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki. Stwierdzono 3 możliwe wzorce unerwienia motorycznego badanego mięśnia: przez aksony z korzeni L4 i L5, wyłącznie L5 lub L5 i L6. Częstość, z jaką występowało unerwienie przez motoneurony z segmentów L4 i L5 wynosiło 25% (n = 4), wyłącznie segmentów L5 – 31% (n = 5), a z segmentów L5 i L6 – 44% (n = 7).

Wyniki dowiodły, że unerwienie motoryczne obu przedziałów różni się w odniesieniu do lokalizacji motoneuronów w rdzeniu kręgowym. Odnotowano przewagę unerwienia z rostralnej (dziobowej) części rdzenia kręgowego w unerwieniu przedziału bliższego. W przedziale tym (n = 8) unerwienie z segmentu L4 i L5 obserwowano w 37% przypadków (n = 3), a unerwienie z segmentu wyłącznie L5 w 63% (n = 5). Nie uzyskano dowodów na obecność unerwienia pochodzącego z segmentów L5 i L6 u żadnego z badanych zwierząt. Natomiast unerwienie przedziału dalszego (n = 8) z segmentu L4 i L5 obserwowano w 13% (n = 1), z segmentu wyłącznie L5 w 63% (n = 6), a z L5 i L6 w 25,0% (n = 2).

Rozkład unerwienia badanego mięśnia na podstawie pomiarów sił skurczu tężcowego zupełnego otrzymany poprzez drażnienie brzusznych korzeni L4, L5 i L6 dla całego mięśnia, jak i obu jego przedziałów przedstawiono w tabeli 2. Choć udział aksonów korzenia L4 był rzadszy niż aksonów korzenia L6, siły skurczu jakie wywoływały one w mięśniu podczas stymulacji były wyższe. Ponadto w odniesieniu do przedziału bliższego, wyraźnie widoczny jest znaczący udział w unerwieniu tej części mięśnia przez aksony z korzenia brzuszego L4.

### 7.3. Parametry skurczu

Średnia siła skurczu tężcowego zupełnego dla całego mięśnia wywołana drażnieniem korzeni L4-L6 zaopatrujących mięsień wynosiła  $6,37 \pm 0,53$  N (3,10 – 9,26 N), natomiast dla przedziału bliższego wynosiła  $2,24 \pm 0,24$  N (1,38 – 3,33 N), a dla dalszego  $4,86 \pm 0,66$  N (2,74 – 7,34 N) (ryc. 11). Przykładowe zapisy skurczów tężcowych zupełnych przedstawiono na rycinie 10. Porównanie średniej siły skurczu mięśnia (6,37 N) z algebraiczną sumą średnich sił skurczów oddzielnie stymulowanych jego przedziałów (7,1 N) wykazało, że proces sumowania sił skurczów obu przedziałów jest nieliniowy, a rejestrowane siły są 11,5% wyższe niż oczekiwane przy założeniu sumowania algebraicznego.

Wyniki pomiarów sił skurczów tężcowych pozwoliły oszacować także siłę skurczu generowaną średnio przez jedno włókno mięśniowe w obrębie całego mięśnia, jak i każdego z dwóch przedziałów. Obliczenia polegały na podzieleniu średniej siły skurczu generowanej przez mięsień (lub przedział badanego mięśnia) przez średnią maksymalną liczbę włókien mięśniowych tego mięśnia (lub przedziału). Mięsień, przedział bliższy oraz dalszy generowały siłę o wartościach odpowiednio: 6,37, 2,24 oraz 4,86 N w trakcie skurczu tężcowego i zawierały odpowiednio 8747, 5521 oraz 5360 włókien mięśniowych. W związku z powyższym, siły obliczone dla pojedynczego włókna wynosiły odpowiednio: 0,73, 0,40 oraz 0,92 mN (ryc. 12).

Średnia siła skurczu pojedynczego dla całego mięśnia wynosiła  $1,65 \pm 0,52$  N (0,80 – 2,66 N), natomiast dla przedziału bliższego  $0,60 \pm 0,37$  N (0,17 – 1,14 N), a dla dalszego  $1,24 \pm 0,47$  N (0,84 – 1,82 N). Zatem w przypadku pomiarów tych sił również odnotowano zjawisko sumowania „mniej niż liniowego”. Siła skurczu pojedynczego mięśnia była o ok. 10% niższa od algebraicznej sumy pojedynczych sił skurczów oddzielenie drażnionych przedziałów (tj. 1,84 N). Parametry czasowe skurczu

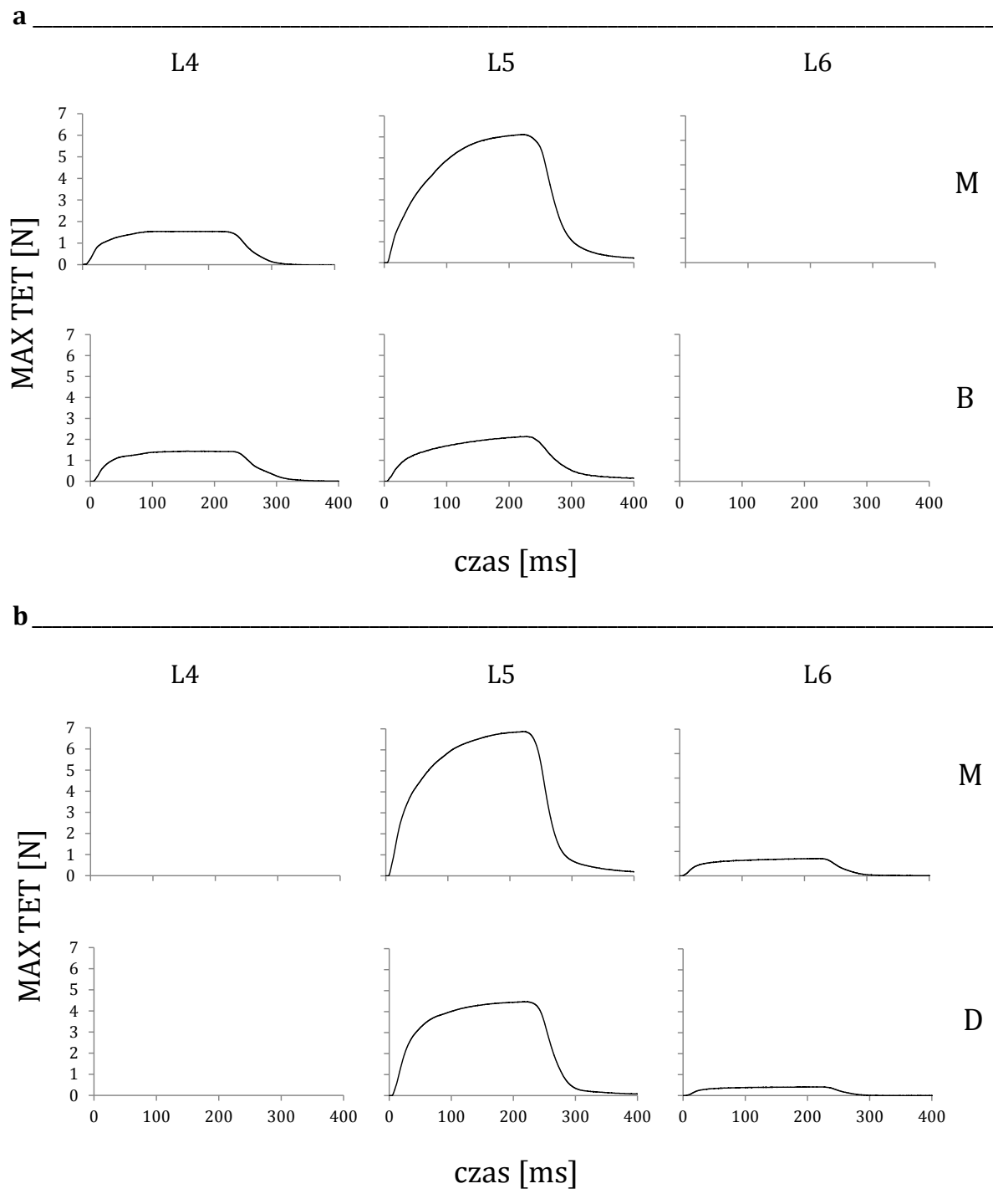
pojedynczego dla poszczególnych korzeni brzusznych przedstawiono w tabeli 3. Nie stwierdzono różnic parametrów czasowych skurczów mięśnia i jego przedziałów dla aktywności wywołanej drażnieniem korzeni brzusznych L5. Jednakże, zaobserwowano tendencję, że najwyższe wartości charakteryzują skurcze wywołane drażnieniem korzeni L4, a najniższe korzeni L6.

#### **7.4. Parametry potencjałów czynnościowych**

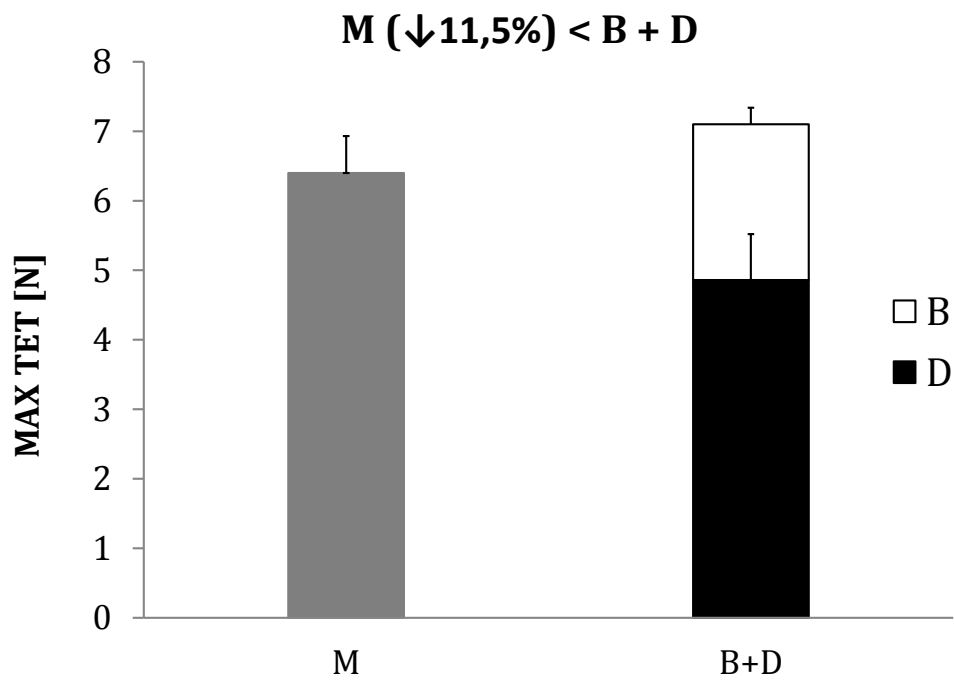
Dane otrzymane z analizy zapisów potencjałów czynnościowych wywołanych podczas pobudzenia mięśnia i jego przedziałów z uwzględnieniem unerwienia z poszczególnych segmentów rdzenia kręgowego zaprezentowane zostały w tabeli 4. Wyniki te potwierdzają obserwacje związane z analizą sił skurczów, gdyż amplitudy potencjałów czynnościowych wywołane w mięśniu, były najwyższe w momencie drażnienia korzenia brzuszego L5, a w przypadku drażnienia korzenia L4 – znacznie wyższe niż w L6. Ponadto w przedziale bliższym amplitudy potencjałów wywołanych przez aksony z korzeni brzusznych L4 i L5 były zbliżone, co wskazuje na znaczący udział aksonów korzenia L4 w unerwieniu tego przedziału. Różnice czasu trwania potencjałów czynnościowych wywołanych przez drażnienie poszczególnych korzeni brzusznych były niewielkie, choć te wywołane przez drażnienie aksonów korzenia L6 miały krótszy czas trwania niż w pozostałych rejestracjach.

**Tabela 2.** Rozkład unerwienia badanego mięśnia na podstawie pomiarów sił skurczu. Wyrażone w procentach średnie wartości  $\pm$  błąd standardowy (szare wiersze) i zakresy (białe wiersze) udziału sił skurczu tężcowego zupełnego mięśnia (M) oraz jego przedziałów: bliższego (B) oraz dalszego (D), wywołanych przez drażnienie korzeni brzusznych L4, L5 oraz L6. Jako 100% przyjęto sumę sił wywołanych drażnieniem korzeni brzusznych L4 i L5 lub wyłącznie L5 lub L5 i L6.

	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>
<b>M</b>	(n = 4)	(n = 16)	(n = 7)
	17,8 $\pm$ 3,0%	94,0 $\pm$ 2,2%	3,56 $\pm$ 1,3%
	9,1 - 19,7%	77,4 - 100,0%	1,3 - 6,0%
<b>B</b>	(n = 3)	(n = 8)	(n = 0)
	36,9 $\pm$ 14,1%	86,2 $\pm$ 8,2%	0%
	9,1 - 55,6%	44,4 - 100,0%	\
<b>D</b>	(n = 1)	(n = 8)	(n = 2)
	9,8%	97,7 $\pm$ 1,3%	4,22 $\pm$ 2,3%
	\	90,2 - 100,0%	1,9 - 6,5%

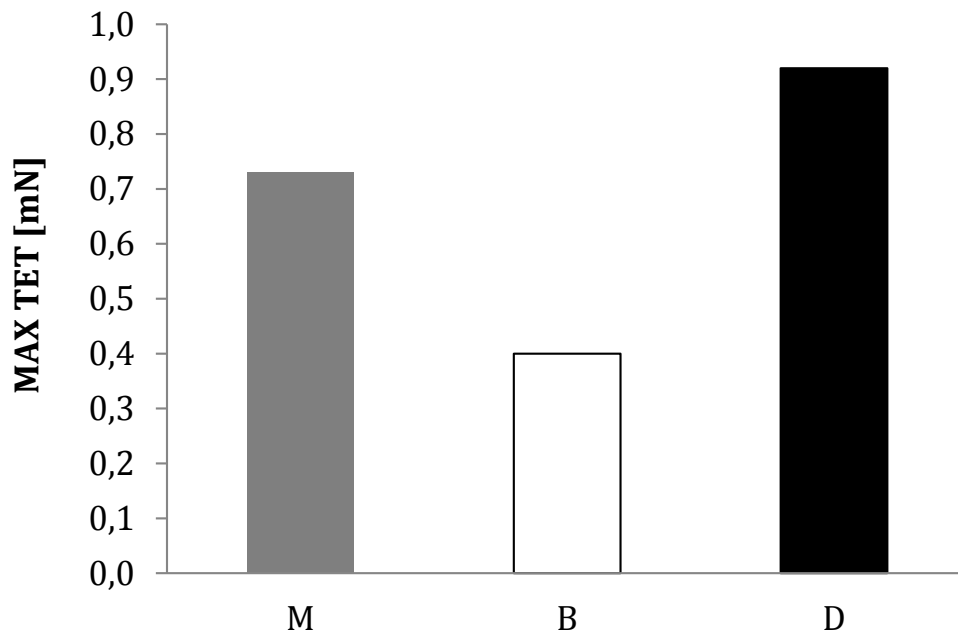


**Rycina 10.** Przykładowe zapisy skurczów tężcowych zupełnych (MAX TET) mięśnia oraz jego przedziałów. Rejestracje pochodzą z dwóch doświadczeń: a – jądro ruchowe zlokalizowane w segmencie L4 i L5, b – jądro ruchowe zlokalizowane w segmencie L5 i L6; M – mięsień jako całość, B – przedział bliższy, D – przedział dalszy.



**Rycina 11.** Średnia siła skurczu tężcowego zupełnego (MAX TET) mięśnia (M), przedziału bliższego (B) oraz przedziału dalszego (D). Fizjologiczna siła skurczu mięśnia jest mniejsza o 11,5% aniżeli algebraiczna suma sił indywidualnie pobudzanych przedziałów. Kreski wskazują błąd standardowy.





**Rycina 12.** Średnia siła skurczu tężcowego zupełnego (MAX TET) pojedynczego włókna mięśniowego w całym mięśniu (M), w przedziale bliższym (B) oraz dalszym (D).

**Tabela 3.** Średnie  $\pm$  błąd standardowy (szare wiersze) i zakresy wartości (białe wiersze) parametrów czasowych skurczu pojedynczego mięśnia (M), jego przedziału bliższego (B) oraz dalszego (D); ct – czas skurczu, hrt – czas połowicznej relaksacji.

<b>M</b>		<b>L4</b> (n = 4)	<b>L5</b> (n = 16)	<b>L6</b> (n = 7)
	ct (ms)	25,3 $\pm$ 2,7	23,1 $\pm$ 0,9	19,5 $\pm$ 1,5
		20,0 - 32,0	18,0 - 32,0	17,0 - 24,0
	hrt (ms)	33,5 $\pm$ 2,6	28,2 $\pm$ 1,0	22,2 $\pm$ 1,7
		29,0 - 41,0	23,0 - 38,0	15,0 - 28,0
<b>B</b>		<b>L4</b> (n = 3)	<b>L5</b> (n = 8)	<b>L6</b> (n = 0)
	ct (ms)	27,0 $\pm$ 3,1	20,8 $\pm$ 1,5	\
		21,0 - 31,0	14,0 - 27,0	\
	hrt (ms)	32,3 $\pm$ 3,5	25,9 $\pm$ 1,6	\
		27,0 - 39,0	18,0 - 32,0	\
<b>D</b>		<b>L4</b> (n = 1)	<b>L5</b> (n = 8)	<b>L6</b> (n = 2)
	ct (ms)	21,0	22,4 $\pm$ 1,9	16,5 $\pm$ 0,5
		\	17,0 - 34,0	16,0 - 17,0
	hrt (ms)	27,0	28,0 $\pm$ 2,2	22,0 $\pm$ 1,0
		\	22,0 - 41,0	21,0-23,0

**Tabela 4.** Średnie  $\pm$  błąd standardowy i zakresy wartości potencjałów czynnościowych mięśnia (M), jego przedziału bliższego (B) oraz dalszego (D); A – amplituda, t (z) – czas między skrajnymi wychyleniami zapisu, t – całkowity czas trwania potencjału czynnościowego.

<b>M</b>		<b>L4</b> (n = 3)	<b>L5</b> (n = 11)	<b>L6</b> (n = 4)
	A [mV]	26,1 $\pm$ 15,0	97,6 $\pm$ 16,1	7,4 $\pm$ 1,3
		3,6 - 54,4	30,4 - 174,9	5,2 - 10,3
	t (z) [ms]	1,4 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3
		1,3 - 1,5	0,7 - 2,8	0,9 - 2,0
	t [ms]	6,6 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,4
		6,0 - 7,2	3,8 - 7,9	3,5 - 5,2
<b>B</b>		<b>L4</b> (n = 2)	<b>L5</b> (n = 7)	<b>L6</b> (n = 0)
	A [mV]	27,0 $\pm$ 24,7	21,7 $\pm$ 7,1	\
		2,3 - 51,6	7,0 - 51,2	\
	t (z) [ms]	2,0 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	\
		1,9 - 2,0	0,7 - 2,0	\
	t [ms]	6,6 $\pm$ 0,6	5,0 $\pm$ 0,2	\
		6,0 - 7,1	3,8 - 5,4	\
<b>D</b>		<b>L4</b> (n = 1)	<b>L5</b> (n = 6)	<b>L6</b> (n = 1)
	A [mV]	17,4	95,2 $\pm$ 29,5	10,1
		\	38,1 - 187,2	\
	t (z) [ms]	1,9	1,7 $\pm$ 0,3	1,8
		\	0,9 - 2,7	\
	t [ms]	5,7	5,4 $\pm$ 0,6	4,0
		\	3,8 - 7,9	\

## 8. Dyskusja

### 8.1. Struktura przedziałów mięśniowych

Pola powierzchni obu przedziałów, jak również liczba i średnica występujących w nich włókien mięśniowych nie są jednakowe. W porównaniu z przedziałem dalszym, bliższy jest mniejszy – krótszy (znajduje się na 3 z 5 badanych poziomów), ma mniejsze pole przekroju poprzecznego, posiada jednak większą liczbę włókien mięśniowych, ale o mniejszej średnicy. Ponadto zaobserwowano, że w obu przedziałach średnica włókien mięśniowych jest zmienna i stopniowo wzrasta wzdłuż mięśnia od części bliższej do dalszej. Różnica średnic włókien w obu przedziałach mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki może być wyjaśniona w oparciu o dane literaturowe dotyczące składu poszczególnych typów włókien mięśniowych. Na ich podstawie wiadomo, że w bliższym przedziale mięśniowym występują włókna typu I i IIA (łącznie ok. 20%), podczas gdy w przedziale dalszym, nie stwierdzono tego typu włókien (De Ruiter i wsp. 1995b). Jednakże w innych badaniach (Vanden Noven i wsp. 1994) wykazano niewielki udział włókien typu I oraz IIA (łącznie ok. 7%). Włókna mięśniowe typu I mają zdecydowanie mniejszą średnicę od włókien szybko kurczących się. Ponadto wykazano, że włókna typu IIX i IIB w bliższym przedziale mają mniejsze średnice w porównaniu z tego samego typu włóknami w dalszym przedziale (Lind i Kernell 1991, De Ruiter i wsp. 1995a).

Skład poszczególnych typów włókien w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki w obu przedziałach wskazuje na możliwość udziału większej proporcji jednostek ruchowych typu S w przedziale bliższym (Vanden Noven i wsp. 1994, De Ruiter i wsp. 1995b). Zaobserwowano także, że jednostki typu FF i FR w bliższym przedziale mięśnia

posiadają mniejsze terytoria aniżeli w dalszym, mają wyższą odporność na zmęczenie, a średnice ich włókien mięśniowych są mniejsze w porównaniu z tego samego typu jednostkami w dalszym przedziale mięśniowym (De Ruyter i wsp. 1996).

Zróźnicowanie proporcji jednostek ruchowych w obu przedziałach mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki szczura zostało dodatkowo potwierdzone eksperymentami neuroanatomicznymi. Badania wielkości neuronów motorycznych wykazały, że bliższa gałąź nerwu zaopatrująca mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki zawiera aksony motoneuronów o małej średnicy perikarionów (w zakresie alfa), natomiast motoneurony z większymi perikarionami należą do części nerwu zaopatrującego dalszy przedział (Vanden Noven i wsp. 1994). Wyniki te odpowiadają obserwacjom różnic wielkości motoneuronów jednostek różnych typów, to jest, S mają najmniejsze, a FF największe motoneurony (Burke i wsp. 1982).

U innych gatunków, w innych mięśniach, przykładowo w mięśniu brzuchatym bocznym u kota, który zawiera 4 przedziały mięśniowe, zaobserwowano przeciwstawne prawidłowości, tzn. najbliższy przedział posiada największą liczbę jednostek ruchowych typu FR, niewiele FF i jeszcze mniej typu S, a przedział położony najbardziej kaudalnie (ogonowo) ma największą liczbę jednostek ruchowych typu S (Weeks i English 1985). Stwierdzono także, że dla tego mięśnia, część puli motoneuronów jądra ruchowego, których aksony docierają do bliższego przedziału, zawiera głównie duże motoneurony (w zakresie alfa, 97%), natomiast niewielki odsetek stanowią małe motoneurony (w zakresie gamma). Przedział dalszy unerwiany jest zarówno przez duże, jak i małe motoneurony w relatywnie jednakowej liczbie (Weeks i English 1985). Może to wskazywać zarówno na inny skład poszczególnych typów włókien mięśniowych w obu przedziałach, jak i różnice w liczbie receptorów (wrzecion mięśniowych).

Włókna mięśniowe nawet w obrębie jednego mięśnia mogą różnić się znacząco długością. Zmienność długości włókien mięśniowych zaobserwowano w różnych

częściach mięśnia brzuchatego łydki (bliższej, środkowej i dalszej) (Huijing 1985, Zuurbier i Huijing 1993, Narici i wsp. 1996, Chow i wsp. 2000). Nie są to wprawdzie obserwacje bezpośrednio dotyczące poszczególnych przedziałów tego mięśnia, jednak z uwagi na opisane położenie włókien można wnioskować, iż spostrzeżenie to dotyczy również włókien mięśniowych poszczególnych przedziałów. W mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki szczura (Zuurbier i Huijing 1993), a także człowieka (Huijing 1985, Narici i wsp. 1996, Chow i wsp. 2000) stwierdzono zróżnicowanie długości włókien mięśniowych. U szczura długość włókien jest mniejsza w bliższej części, odpowiadającej przedziałowi bliższemu (Zuurbier i Huijing 1993), natomiast dostępne dane literaturowe o długości włókien u człowieka są rozbieżne. Huijing (1985) dokonał pomiarów na materiale pobranym *post mortem* i zaobserwował, iż włókna mięśniowe bliższej części mięśnia są krótsze (średnio 44,3 mm) aniżeli dalszej (średnio 59,8 mm). Dane te są sprzeczne z badaniami *in vivo*, w których stwierdzono, że włókna mięśniowe położone w bliższej części mięśnia są dłuższe (średnio 39,6 mm) w porównaniu z włóknami położonymi w części dalszej (średnio 31,2 mm) (Narici i wsp. 1996). Ze zmianą długości włókien mięśniowych wiąże się także obserwacja, że liczba sarkomerów nie jest identyczna dla poszczególnych obszarów mięśnia. W omawianym mięśniu szczura zaobserwowano większą liczbę sarkomerów we włóknach mięśniowych z dalszego regionu (Huijing 1985, Zuurbier i Huijing 1993).

## **8.2. Unerwienie motoryczne**

Jak wspomniano we wstępie, dane literaturowe wskazują, że mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki szczura unerwiony jest przez dwa korzenie lędźwiowe (L4 i L5), zatem jądro ruchowe tego mięśnia rozmieszczone jest wzdłuż dwóch segmentów rdzenia kręgowego (Hashizume i wsp. 1988). Obserwacja ta dotyczyła samców szczura.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż u samic mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki zaopatrują przede wszystkim motoneurony, które położone są w segmencie L5. Jednakże unerwienie to jest w pewnym stopniu zmienne osobniczo i może pochodzić z segmentów L4 i L5, wyłącznie L5 lub L5 i L6 (tab. 2). Istnieje zatem możliwość niewielkiego przesunięcia jądra ruchowego w kierunku rostralnym (dziobowym) lub kaudalnym, co wskazuje na różnice w odniesieniu do danych dla samców. Wyniki te sugerują występowanie międzypłciowych różnic w zakresie organizacji części lędźwiowej rdzenia kręgowego, przypuszczalnie związanych z różnicami unerwienia i budowy organów płciowych, zaopatrywanych przez aksony z lędźwiowych segmentów rdzenia kręgowego u obu płci. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w odrębnej serii doświadczeń.

Wyniki pomiarów sił skurczu pokazują, iż przedział bliższy badanego mięśnia może być unerwiony z poziomu L5 lub L4 i L5, ze znaczącym udziałem aksonów z poziomu L4, natomiast przedział dalszy mięśnia – z poziomu L4 i L5 lub L5 lub L5 i L6 (tab. 2, rycina 10). Zapewne ma to związek z ogólną organizacją unerwienia mięśni szkieletowych, zgodnie z którą mięśnie położone wyżej wzdłuż osi ciała oraz wyżej na kończynie unerwione są przez nerwy pochodzące z wyżej położonych segmentów rdzenia kręgowego, a położone niżej – przez nerwy odchodzące od segmentów położonych w niższej części rdzenia kręgowego (Romases 1951, Sharrard 1964).

Motoneurony unerwiające bliższą część mięśnia rozmieszczone są bardziej rostralnie w jądrze ruchowym, a motoneurony unerwiające dalszą część – kaudalnie. Taki rozkład motoneuronów odnotowano także w całej grupie mięśni trójgłowych łydki kota (Weeks i English 1985, 1987). Badania Weeks i English (1985) wskazały także, iż każdy przedział jest unerwiony przez przestrzennie skupione grupy motoneuronów, których pulę nazwano jądrem przedziałowym (ang. compartment nucleus). Dostępne dane literaturowe wspierają topograficzną relację między położeniem motoneuronów w

jądrach ruchowych a unerwieniem niektórych mięśni: mięśnia piszczelowego przedniego kota (Ilia i Dum 1984), mięśnia pośladkowego wielkiego kota (Harriman i Brown 1985) oraz mięśni płatowatych kota (Richmond i wsp. 1985). Jednak niektórzy badacze nie zaobserwowali zróżnicowanej dystrybucji motoneuronów w jądrach ruchowych mięśnia krawieckiego i napinacza powięzi szerokiej (Gordon i wsp. 1991) oraz w mięśniach podpotylicznych i międzyżebrowych szyi kota (Gordon i Richmond 1991).

### **8.3. Analizy zapisów sił skurczu**

Przedział dalszy badanego mięśnia ma mniejszą liczbę włókien mięśniowych niż przedział bliższy, ale składa się w większej proporcji z włókien mięśniowych szybko kurczących się o większych średnicach (Vanden Noven i wsp. 1994, De Ruiters i wsp. 1995a) oraz o większej długości (Zuurbier i Huijing 1993). Wiadomo także, iż jednostki ruchowe szybko kurczące się w dalszym przedziale mięśniowym generują wyższe siły skurczu niż jednostki tego samego typu w przedziale bliższym. Siła skurczu tężcowego zupełnego dla tych jednostek w przedziale bliższym i dalszym wynosiła odpowiednio:  $87 \pm 27$  mN (FR) i  $142 \pm 25$  mN (FF) oraz  $154 \pm 53$  mN (FR) i  $229 \pm 86$  mN (FF) (De Ruiters i wsp. 1996). Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, iż średnia wartość siły skurczu tężcowego zupełnego dla przedziału dalszego wynosiła 4,86 N, natomiast dla bliższego 2,24 N. Dostępne w literaturze wyniki badań dotyczące parametrów skurczu włókien w dwóch przedziałach mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki samców szczura również wskazują, iż siły skurczu pojedynczego, jak i skurczu tężcowego mają większe wartości dla przedziału dalszego. De Ruiters i wsp. (1995a) podają, że wartości siły skurczu tężcowego zupełnego u samców szczura rasy Wistar (drażnienie przy częstotliwości 120 Hz) mieściły się w zakresie 1,71 – 4,03 N w



przedziale bliższym oraz 2,92 – 6,26 N w przedziale dalszym, a średnio wynosiły odpowiednio:  $2,9 \pm 0,6$  N oraz  $5,3 \pm 1,1$  N (De Ruitter i wsp. 1995b). W prezentowanych doświadczeniach uzyskano niższe wyniki, co może wiązać się z mniejszą masą mięśni u samic niż u samców.

W celu zbadania unerwienia motorycznego przedziałów mięśniowych wykorzystano zarówno analizy sił skurczu, jak i amplitud potencjałów czynnościowych wywołanych drażnieniem trzech korzeni brzusznych L4, L5 i L6. Obie metody dały zbliżone wyniki dotyczące unerwienia motorycznego z poszczególnych segmentów rdzenia kręgowego. Aksony korzenia L5 wywołały skurcze w każdym przypadku i miały największy udział w unerwieniu mięśnia. W przedziale bliższym stwierdzono wyższy udział siły spowodowany pobudzeniem korzenia L4 (średnio 36,9% siły przedziału), podczas gdy korzeń L6 nie wniósł żadnego udziału w jego unerwieniu. W dalszym przedziale również większe znaczenie w sile skurczu miało unerwienie z segmentu L4 (średnio 9,8% siły przedziału) aniżeli L6 (średnio 4,2% siły przedziału). Jednakże, unerwienie z segmentu L6 charakteryzowało się większą częstością występowania w tym przedziale (tab. 2).

Parametry czasowe skurczu pojedynczego, to jest czas skurczu oraz czas połowicznej relaksacji dla poszczególnych korzeni, wskazały, iż najwyższe wartości wystąpiły przy drażnieniu korzenia L4 (tab. 3). Prawdopodobnie ma to związek z faktem, iż korzeń ten unerwia więcej włókien wolno kurczących się.

Liczba pobudzonych włókien mięśniowych jest odzwierciedlona w amplitudzie potencjałów czynnościowych. Włókna mięśniowe jednostek ruchowych generujące wyższą siłę, mają potencjały czynnościowe o większej amplitudzie (Kwa i wsp. 1995, van Eijden i Turkawski 2001, Krutki i wsp. 2013). Średnica włókien mięśniowych (a więc i typ włókien) oraz ich długość (Dumitru i King 1999) mają natomiast większe znaczenie dla czasu trwania potencjałów czynnościowych (Hakansson 1956). Włókna o

większej średnicy mają potencjały czynnościowe o krótszym czasie trwania. Analizy amplitudy potencjałów wywołanych wykazały, że największy udział w unerwieniu mięśnia, jak i jego przedziałów mają aksony korzenia brzuszego L5 (tab. 4). Czasy trwania potencjałów były najdłuższe przy pobudzaniu korzenia L4, najkrótsze przy L6, co prawdopodobnie wiąże się z dokonaną obserwacją, iż włókna w części dalszej, mają większe średnice aniżeli w bliższej (tab. 4) i zarazem większe prędkości przewodzenia potencjałów czynnościowych.

W prezentowanym badaniu stwierdzono, że matematyczna suma sił skurczów maksymalnych osobno pobudzanych przedziałów wynosi 7,10 N i jest większa od wartości siły skurczu maksymalnego całego mięśnia o ok. 11%. Wynik ten wyraźnie wskazuje, że proces sumowania sił skurczu obu przedziałów nie ma charakteru prostego sumowania algebraicznego i jest procesem „mniej niż linowym”. Sumowanie sił skurczu różnych włókien mięśniowych jest zjawiskiem biomechanicznym i wydaje się być zależne od topograficznych relacji w mięśniu czynnych jednocześnie jednostek ruchowych (Drzymała-Celichowska i wsp. 2010). Ponadto pierzasty układ włókien mięśniowych może przyczynić się do nieliniowego sumowania sił (Sandercock 2000). Ma to związek ze zmianą kąta nachylenia włókien mięśniowych do osi mięśnia i kąta pierzastości podczas skurczu (Zuurbier i Huijing 1992, Sandercock 2000). Znanym z literatury faktem jest, że procesy sumowania sił skurczu jednostek ruchowych w mięśniach szkieletowych są nieliniowe (Emonet-Denand i wsp. 1987, Clamann i Schelhorn 1988, Powers i Binder 1991). Dostępne dane literaturowe nie dostarczają jednak żadnych danych dotyczących sumowania sił skurczów przedziałów obejmujących wyraźnie odrębne części mięśnia. Istnieją natomiast doniesienia dotyczące sumowania sił skurczów zespołów włókien mięśniowych kończyn kota pobudzanych poprzez drażnienie korzenia brzuszego nerwu rdzeniowego (Sandercock 2000, 2003). Doświadczenie takie przeprowadzono na mięśniu płaszczkowatym

(Sandercock 2000) oraz piszczelowym przednim (Sandercock 2003). W badaniach tych, korzeń brzuszny dzielono na dwa fragmenty w taki sposób, aby każdy z nich unerwiał połowę badanego mięśnia. Obie części mięśnia drażniono ciągiem pobudzeń z częstotliwością 100 Hz, wywołując skurcz maksymalny jednocześnie, a następnie każdą część drażniono oddzielnie. W eksperymentach tych jednoczesne pobudzenie dwóch fragmentów korzenia wywołało siłę skurczu mięśnia mniejszą średnio o około 6% aniżeli algebraiczna suma sił skurczów indywidualnie pobudzanych fragmentów korzenia brzuszego. Wynik tego eksperymentu wskazał, iż sumowanie sił zespołów jednostek ruchowych o włóknach mięśniowych przemieszanych ze sobą jest także procesem „mniej niż liniowym”. W innych doświadczeniach badano także interakcję między mięśniem brzuchatym bocznym łydki a płaszczkowatym i brzuchatym przyśrodkowym łydki oraz w jeszcze innych eksperymentach między dwugłowym uda i obszernym bocznym u kota. Sumowanie sił skurczów w każdym z tych doświadczeń okazało się procesem nieliniowym, a efekty sumowania sił mniejsze o 10% od oczekiwanej wartości na podstawie algebraicznego sumowania maksymalnych sił (Sandercock i Maas 2009).

Przedstawione procesy sumowania sił skurczu dotyczą sytuacji zachodzących w warunkach eksperymentu, gdzie współpracujące włókna mięśniowe kurczą się synchronicznie w obrębie jednego lub obu przedziałów jednocześnie. Jednakże, w warunkach fizjologicznych pracują tylko niektóre jednostki ruchowe, pobudzane w sposób niesynchroniczny, a siła skurczu generowana przez przemieszane ze sobą włókna mięśniowe może być przenoszona poprzez włókna kolagenowe tkanki łącznej na sąsiadujące włókna mięśniowe. Procesy te zbadano na mięśniu prostowniku długim palców szczura, składającym się z czterech głów, gdzie stwierdzono, iż występuje transmisja siły z głów mięśnia poddanych tenotomii do sąsiadujących, nienaruszonych głów i odwrotnie. Wielkość tej transmisji była uzależniona od stopnia integralności

tkanki łącznej na styku pomiędzy głowami mięśnia. Zaobserwowano także, siła skurczu pozostawała na bardzo wysokim poziomie po tenotomii nawet trzech głów tego mięśnia (Huijing i wsp. 1998). Transmisję siły zaobserwowano również z mięśnia płaszczkowatego na mięsień brzuchaty boczny (po tenotomii) u kota. Autorzy badań podkreślają, że tkanka łączna może przekazywać w przeniesieniu poprzecznym nawet 50% siły (Sandercock i Maas 2009).

#### **8.4. Znaczenie funkcjonalne**

Wiedza dotycząca zagadnienia struktury, czynności oraz unerwienia przedziałów mięśniowych ma przede wszystkim znaczenie poznawcze w odniesieniu do fizjologii mięśni szkieletowych, ale także jest istotna dla problematyki nauk o zdrowiu: traumatologii, biomechaniki i kinezylogii.

Mięśnie, w których występują przedziały mięśniowe biorą udział w różnych funkcjach. Znajomość procesów generacji i transmisji siły skurczu w poszczególnych przedziałach, ich organizacji przestrzennej, struktury i aktywacji przedziałów, ma duże znaczenie dla lepszego zrozumienia ich czynności w odniesieniu do kontroli motorycznej. Wiedza ta jest istotna także dla nauk klinicznych, gdyż znajomość unerwienia mięśnia z poszczególnych segmentów rdzenia pozwala określić stopień zaburzeń w funkcjonowaniu mięśnia i jego poszczególnych przedziałów w przypadku częściowego uszkodzenia unerwienia, np. przy jednopoziomowym uszkodzeniu korzenia brzuszego nerwu rdzeniowego.

Czynność przedziałów mięśniowych jest wzajemnie od siebie zależna. Transmisja siły przez przedziały mięśniowe może być zaburzona w przypadku nieprawidłowego położenia mięśni, które spowodowane jest ich hiper- lub hipotonią. Taki stan ma miejsce między innymi przy rozmaitych wadach w obrębie układu ruchu (np. wadach postawy),

ale także po urazach i interwencjach chirurgicznych. Wiele mięśni posiada przedziały, które podczas skurczu współpracują ze sobą. Przy zmianie kąta przebiegu włókien mięśniowych w przedziałach może dojść do zmiany ich biomechanicznych warunków pracy, co wpływa na zaburzenie istotnych dla funkcjonowania mięśni prawidłowych procesów transmisji siły w poprzek i wzdłuż włókien mięśniowych.

Wewnątrzmięśniowe unerwienie i rozmieszczenie przedziałów mięśniowych ma istotne znaczenie także w chirurgii rekonstrukcyjnej (traumatologii) przy przeszczepach mięśni, a zwłaszcza w funkcjonalnych przeszczepach poszczególnych przedziałów mięśniowych (Yu i wsp. 2010). Mięsień odwodziciel palucha został z powodzeniem użyty w odtworzeniu policzka u młodych pacjentów z porażeniem mięśni twarzy (Jiang i wsp. 1995). Ortak i wsp. (2006) zaobserwowali, że unerwiony fragment mięśnia najszerszego grzbietu może być użyty w rekonstrukcji zginaczy i prostowników palców. Fattah i wsp. (2010) opisali, że płat mięśnia smukłego, a zarazem jeden przedział, jest elementem przeszczepianym w procedurach chirurgicznych rekonstrukcji piersi, podobnie jak unerwione wycinki mięśnia piersiowego mniejszego wykorzystywane są przy operacjach rekonstrukcji ramienia, klatki piersiowej i przedniej części szyi (Moinfar i Murthi 2007).

Z powyższych przykładów wynika, iż zagadnienie unerwienia i struktury mięśni jest bardzo istotne w świetle problematyki zdrowia w przypadku przeszczepów mięśniowych, uszkodzeń nerwów rdzeniowych a także wszelkich zaburzeń warunków pracy mięśni.

## 8.5. Ograniczenia metodyczne

Podobnie jak wszystkie metody wykorzystywane w eksperymentach naukowych, również techniki zastosowane w niniejszych badaniach mają pewne wady i ograniczenia.

Preparatyka zastosowana w metodzie histochemicznej oraz elektrofizjologicznej mogła doprowadzić do częściowego uszkodzenia włókien ruchowych nerwu kulszowego, a tym samym wpływać na zmniejszenie rejestrowanej siły skurczu. Nastąpić mogło również uszkodzenie włókien mięśniowych, a także powierzchniowych naczyń włosowatych oraz przebiegających w mięśniu, w pobliżu jego powierzchni fragmentów aksonów. W takiej sytuacji proces wyczerpania glikogenu mógł być zaburzony. Prawdopodobny efekt uszkodzenia włókien nerwowych (w tym dochodzących do dwóch odrębnych przedziałów) widoczny jest na wszystkich skrawkach mięśniowych poddanych wyczerpaniu glikogenu (oraz reakcji PAS) pod postacią obwodowo ułożonego pasma włókien mięśniowych, w których nie udało się wyczerpać glikogenu (ryc. 13). Podobny problem widoczny jest na zdjęciach publikowanych przez innych autorów (De Ruiten i wsp. 1995a).

Inne ograniczenia metodyczne wiążą się z precyzją określenia granic przedziałów mięśniowych. Na wielu badanych skrawkach obserwowano, iż granica pomiędzy przedziałem bliższym a dalszym nie w każdym miejscu jest wyraźna (ryc. 14).

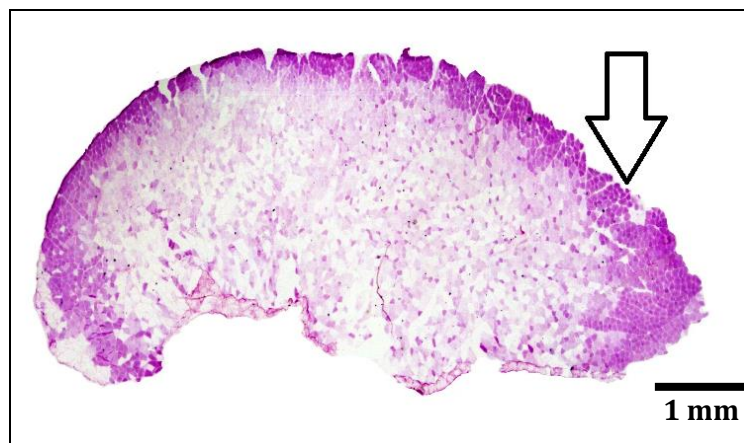
W metodzie histochemicznej pewnym utrudnieniem jest także wyczerpanie glikogenu z przedziału bliższego. W celu uwidocznienia przedziałów, wyczerpywano glikogen głównie z przedziału dalszego. Przyczyną tego wyboru był fakt, iż przedział dalszy składa się wyłącznie (de Ruiten i wsp. 1995b) lub w większej proporcji (Vanden Noven i wsp. 1994) z włókien szybko kurczących się, z których w krótszym czasie można wyczerpać glikogen (50 min drażnienia) w porównaniu z włóknami z przedziału

bliższego (90 min) (de Ruiten i wsp. 1995a). Znaczenie ma także czas ekspozycji wyizolowanego nerwu kulszowego na czynniki zewnętrzne. Im czas ten jest dłuższy, tym większe prawdopodobieństwo uszkodzenia jego aksonów.

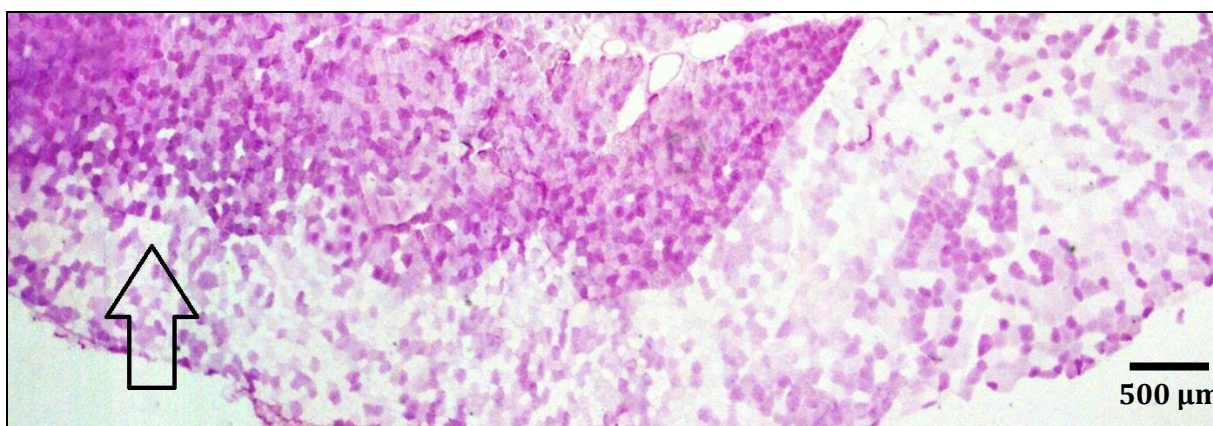
Kolejną kwestią są dość duże rozmiary mięśnia i utrudnienia występujące przy technice mrożenia w schłodzonym do temp. ok.  $-190^{\circ}\text{C}$  izopentanie. Na tym etapie postępowania nieuniknione jest pęknięcie mięśnia wzdłuż pasm tkanki łącznej, co wpływa niekorzystnie na jednolitość skrawków, a więc i utrudnia analizę preparatu pod mikroskopem.

Ograniczeniem metody elektrofizjologicznej jest pewne prawdopodobieństwo uszkodzenia części włókien korzeni rdzeniowych (lub nerwów) podczas ich izolacji i eliminacji części aksonów, co może doprowadzić do obniżenia rejestrowanej siły skurczu mięśnia. Ponadto pomiary sił skurczów dokonane zostały w warunkach izolowanych (mięsień brzuchaty został odcięty od sąsiadującej grupy mięśni trójgłowych łydki) oraz izometrycznych, co nie stanowi odzwierciedlenia warunków fizjologicznych.

Dość często obserwuje się także osobniczą zmienność w liczbie i rozmiarach pośrednich gałązek nerwu dochodzącego do mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki szczura. U niektórych osobników dalsza gałąź nerwu wchodząca do mięśnia dzieli się na dwie gałązki. Jeśli gałąź bliższa jest mała, często występują dwie gałązki pośrednie, podczas gdy relatywnie grubej gałęzi bliższej może towarzyszyć tylko jedna gałązka pośrednia (De Ruiten i wsp. 1995a).



**Rycina 13.** Skrawek mięśniowy (75% długości mięśnia) z wyczerpanym glikogenem z przedziału dalszego. Strzałką zaznaczono obwodowe pasmo włókien mięśniowych z niewyczerpanym glikogenem.



**Rycina 14.** Skrawek mięśniowy (25% długości mięśnia) z wyczerpanym glikogenem z przedziału dalszego. Strzałką zaznaczono niewyraźną granicę pomiędzy dwoma przedziałami.



## 9. Podsumowanie i wnioski

1. Zarówno średnica jak i liczba włókien mięśniowych badanego mięśnia w bliższym i dalszym przedziale różniły się istotnie. W porównaniu z przedziałem dalszym, bliższy jest mniejszy, posiada jednak większą liczbę włókien mięśniowych, ale o mniejszej średnicy. Ponadto zaobserwowano, że w obu przedziałach średnica włókien mięśniowych stopniowo wzrastała wzdłuż mięśnia od części bliższej do dalszej.
2. Stwierdzono zmienność osobniczą w odniesieniu do lokalizacji jądra ruchowego badanego mięśnia w poszczególnych segmentach rdzenia. Rozłożenie aksonów motoneuronów unerwiających badany mięsień występowało w jednym z trzech wariantów: L4 i L5, wyłącznie L5 lub L5 i L6. Aksony korzenia L4 miały wyraźnie większy udział w unerwieniu przedziału bliższego aniżeli dalszego.
3. Proces sumowania sił skurczu generowanych przez włókna mięśniowe każdego z obu przedziałów był nieliniowy, a siła skurczu całego mięśnia była mniejsza o około 11 % aniżeli algebraiczna suma sił skurczów indywidualnie pobudzanych przedziałów. Przyczyny tego zjawiska mają zapewne podłoże biomechaniczne.

## 10. Literatura

1. **Balice-Gordon** RJ, Thompson WJ. The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Physiology* 1988; 398: 211-231.
2. **Bennett** MR, Ho S. The formation of topographical maps in developing rat gastrocnemius muscle during synapse elimination. *Journal of Physiology* 1988; 396: 471-96. nervation in rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Physiology* 1988; 398: 211-231.
3. **Bodine** SC, Roy RR, Meadows DA, Zernicke RF, Sacks RD, Fournier M, Edgerton VR. Architectural, histochemical, and contractile characteristics of a unique biarticular muscle: the cat semitendinosus. *Journal of Neurophysiology* 1982; 48: 192-201.
4. **Brooke** MH, Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1970; 18: 670-672.
5. **Brown** MC, Jansen JK, Van Essen D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *Journal of Physiology* 1976; 261: 387-422.
6. **Burke** RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *Journal of Physiology* 1973; 234: 723-748.
7. **Burke** RE, Tsairis P. Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius. *Journal of Physiology* 1973; 234: 749-765.
8. **Burke** RE, Strick PL, Kanda K, Kim CC, Walmsley B. Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 1977; 40: 667-680.
9. **Burke** RE. Motor units: anatomy, physiology and functional organization. *Handbook of physiology* 1981; Bethesda, MD: American Physiology Society.
10. **Burke** RE, Dum RP, Fleshman JW, Glenn LL, Lev-Tov A, O'Donovan MJ, Pinter MJ. A HRP study of the relation between cell size and motor unit type in cat ankle extensor motoneurons. *Journal of Comparative Neurology* 1982; 209: 17-28.
11. **Celichowski** J, Taborowska M. The contractile properties of the medial gastrocnemius motor units innervated by L4 and L5 spinal nerves in the rat. *Somatosensory & Motor Research* 2011; 28: 25-30.
12. **Celichowski** J, Drzymała H. Differences between properties of male and female motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 57: 83-93.
13. **Celichowski** J, Drzymała-Celichowska H. The number of motor units in the medial gastrocnemius muscle of male and female rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 58: 821-828.
14. **Chanaud** CM, Pratt CA, Loeb GE. Functionally complex muscles of the cat hindlimb. II. Mechanical and architectural heterogeneity within the biceps femoris. *Experimental Brain Research* 1991; 85: 257-270.

15. **Chang** Y, Cantelmi D, Wisco JJ, Fattah A, Hannam AG, Agur AM. Evidence for the functional compartmentalization of the temporalis muscle: a 3-dimensional study of innervation. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* 2013; 71: 1170-1177.
16. **Clamann** HP, Schelhorn TB. Nonlinear force addition of newly recruited motor units in the cat hindlimb. *Muscle Nerve* 1988; 11: 1079-1089.
17. **Chow** RS, Medri MK, Martin DC, Leekam RN, Agur AM, McKee NH. Sonographic studies of human soleus and gastrocnemius muscle architecture: gender variability. *European Journal of Applied Physiology* 2000; 82: 236-244.
18. **Cole** WV. Morphological characteristics of the motor end plate of the rat (*Mus norvegicus*). *The Anatomical Record* 1947; 98: 393-400.
19. **da Silva Costa** RM, Kung J, Poukens V, Yoo L, Tychemsen L, Demer JL. Intramuscular innervation of primate extraocular muscles: unique compartmentalization in horizontal recti. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011; 52: 2830-2836.
20. **Dennis** MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Developmental Biology* 1981; 81: 266-279.
21. **De Ruiter** CJ, De Haan A, Sargeant AJ. Physiological characteristics of two extreme muscle compartments in gastrocnemius medialis of the anaesthetized rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 1995a; 153: 313-324.
22. **De Ruiter** CJ, De Haan A, Sargeant AJ. Repeated force production and metabolites in two medial gastrocnemius muscle compartments of the rat. *Journal of Applied Physiology* . 1995b; 79: 1855-1861.
23. **De Ruiter** CJ, De Haan A, Sargeant AJ. Fast-twitch muscle unit properties in different rat medial gastrocnemius muscle compartments. *Journal of Neurophysiology* 1996; 75: 2243-2254.
24. **Donahue** SP, English AW. The role of synapse elimination in the establishment of neuromuscular compartments. *Developmental Biology* 1987; 124: 481-489.
25. **Donahue** SP, English AW. Selective elimination of cross-compartmental innervation in rat lateral gastrocnemius muscle. *Journal of Neuroscience* 1989; 9: 1621-1627.
26. **Donoghue** MJ, Alvarez JD, Merlie JP, Sanes JR. Fiber type- and position-dependent expression of a myosin light chain-CAT transgene detected with a novel histochemical stain for CAT. *Journal of Cell Biology* 1991; 115: 423-434.
27. **Donselaar** Y, Kernell D, Eerbeek O, Verhey BA. Somatotopic relations between spinal motoneurons and muscle fibres of the cat's musculus peroneus longus. *Brain Research* 1985; 335: 81-88.
28. **Drzymala-Celichowska** H, Krutki P, Celichowski J. Summation of motor unit forces in rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of Electromyography & Kinesiology* 2010; 20: 599-607.
29. **Dubowitz** V. The biopsy: normal and diseased muscle. In *Muscle Biopsy. A practical approach* (V. Dubowitz, ed). London: Bailliere Tindall, 1985.
30. **Dumitru** D, King JC. Motor unit action potential duration and muscle length. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1188-1195.
31. **Eccles** JC, Eccles RM, Lundberg A. Synaptic actions on motoneurons caused by impulses in Golgi tendon organ afferents. *Journal of Physiology* 1957; 138: 227-252.

32. **Emonet-Dénand** F, Laporte Y, Proske U. Contraction time of twitches of muscle fibers situated in two neighboring muscles and innervated by the same axon. *Journal of Physiology (Paris)* 1970; 62: 275.
33. **Emonet-Dénand**, Filippi GM, Laporte Y, Petit J. Summation of maximal tetanic tensions developed by slow or fast motor units of the peroneus longus muscle in the cat. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III* 1987; 305: 417-422.
34. **English** AW, Letbetter WD. Anatomy and innervation patterns of cat lateral gastrocnemius and plantaris muscles. *American Journal of Anatomy* 1982a; 164: 67-77.
35. **English** AW, Letbetter WD. A histochemical analysis of identified compartments of cat lateral gastrocnemius muscle. *Anatomical Record* 1982b; 204: 123-130.
36. **English** AW, Eason J, Schwartz G, Shirley A, Carrasco DI. Sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle: myosin heavy chain composition of neuromuscular compartments. *Cells Tissues Organs* 1999; 164: 179-191.
37. **English** AW, Weeks OI. Compartmentalization of single muscle units in cat lateral gastrocnemius. *Experimental Brain Research* 1984; 56: 361-368.
38. **Ettema** GJ. Elastic and length-force characteristics of the gastrocnemius of the hopping mouse (*Notomys alexis*) and the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Experimental Biology* 1996; 199: 1277-1285.
39. **Fatt** P. The electromotive action of acetylcholine at the motor end-plate. *Journal of Physiology* 1950; 111: 408-422.
40. **Fattah** A, Figus A, Mathur B, Ramakrishnan VV. The transverse myocutaneous gracilis flap: technical refinements. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2010; 63: 305-313.
41. **Gallo** M, Gordon T, Tyreman N, Shu Y, Putman CT. Reliability of isolated isometric function measures in rat muscles composed of different fibre types. *Experimental Physiology* 2004; 89: 583-592.
42. **Gardiner** PF, Jasmin BJ, Corriveau P. Rostrocaudal pattern of fiber-type changes in an overloaded rat ankle extensor. *Journal of Applied Physiology* 1991; 71: 558-564.
43. **Gatesy** SM, English AW. Evidence for compartmental identity in the development of the rat lateral gastrocnemius muscle. *Developmental Dynamics* 1993; 196: 174-182.
44. **Grottel** K, Celichowski J: Division of motor units in medial gastrocnemius muscle of the rat in light of variability of their principal properties. *Acta Neurobiologica Experimentalis* 1990, 50: 571-588.
45. **Grottel** K, Krutki P. Organizacja mięśnia i sterowanie ruchem. Część II. Sterowanie ruchem. *AWF* 1996 nr 46.
46. **Gordon** DC, Loeb GE, Richmond FJ. Distribution of motoneurons supplying cat sartorius and tensor fasciae latae, demonstrated by retrograde multiple-labelling methods. *Journal of Comparative Neurology* 1991; 304: 357-372.
47. **Gordon** DC, Richmond FJ. Distribution of motoneurons supplying dorsal suboccipital and intervertebral muscles in the cat neck. *Journal of Comparative Neurology* 1991; 304: 343-356.

48. **Hakasson** CH. Conduction velocity and amplitude of the action potential as related to circumference in the isolated fibre of frog muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1956; 37: 14-34.
49. **Harriman** VJ, Brown MC. Spatial organization within rat motoneuron pools. *Neuroscience Letters* 1985; 60: 325-329.
50. **Hashizume** K, Kanda K, Burke RE. Medial gastrocnemius motor nucleus in the rat: age-related changes in the number and size of motoneurons. *Journal of Comparative Neurology* 1988; 269: 425-430.
51. **Huijing** PA. Architecture of the human gastrocnemius muscle and some functional consequences. *Acta Anatomica* 1985; 123: 101-107.
52. **Huijing** PA, Baan GC, Rebel GT. Non-myotendinous force transmission in rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Experimental Biology* 1998; 201: 683-691.
53. **Hulliger** M. The mammalian muscle spindle and its central control. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 1984; 101: 1-110.
54. **Iliya** AR, Dum RP. Somatotopic relations between the motor nucleus and its innervated muscle fibers in the cat tibialis anterior. *Experimental Neurology* 1984; 86: 272-292.
55. **Jiang** H, Guo ET, Ji ZL, Zhang ML, Lu V. One-stage microneurovascular free abductor hallucis muscle transplantation for reanimation of facial paralysis. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1995; 96: 78-85.
56. **Kanda** K, Hashizume K. Factors causing difference in force output among motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of Physiology* 1992; 448: 677-695.
57. **Kandel** E, Schwartz J, Jessell T. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Medical; 4 edition 2000.
58. **Keen** DA, Fuglevand AJ. Common input to motor neurons innervating the same and different compartments of the human extensor digitorum muscle. *Journal of Neurophysiology* 2004; 91: 57-62.
59. **Krutki** P, Ciechanowicz-Kowalczyk I, Łochyński D, Celichowski J. Effect of aging on properties of motor unit action potentials in the rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of Electromyography & Kinesiology* 2013; 23: 1150-1157.
60. **Krysiak** K, Kobryń H, Kobryńczuk F. *Anatomia Zwierząt. Aparat Ruchowy. Tom 1*. PWN 2001.
61. **Kwa** SH, Korfage JA, Weijs WA. Function-dependent anatomical parameters of rabbit masseter motor units. *Journal of Dental Research* 1995; 74: 1649-1657.
62. **Laskowski** MB, High JA. Expression of nerve-muscle topography during development. *Journal of Neuroscience* 1989; 9: 175-82.
63. **Lind** A, Kernell D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: a "two-dimensional" quantitative approach. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1991; 39: 589-597.
64. **Lowrie** MB, O'Brien RA, Vrbová G. The effect of altered peripheral field on motoneurone function in developing rat soleus muscles. *Journal of Physiology* 1985; 368: 513-524.
65. **Mierzejewska-Krzyżowska** B, Drzymała-Celichowska H, Celichowski J. Gender differences in the morphometric properties of muscle fibres and the innervation ratio of

- motor units in rat medial gastrocnemius muscle. *Anatomia Histologia Embryologia* 2011; 40: 249-255.
66. **Mierzejewska-Krzyżowska** B, Bukowska D, Taborowska M, Celichowski J. Sex Differences in the Number and Size of Motoneurons Innervating Rat Medial Gastrocnemius Muscle. *Anatomia Histologia Embryologia* 2014; 43: 182-189.
  67. **Moinfar** AR, Murthi AM. Anatomy of the pectoralis minor tendon and its use in acromioclavicular joint reconstruction. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 2007; 16: 339-346.
  68. **Mu** L, Sanders I. Neuromuscular specializations of the pharyngeal dilator muscles: I. Compartments of the canine geniohyoid muscle. *Anatomical Record* 1998; 250: 146-153.
  69. **Mu** L, Sanders I. Neuromuscular specializations of the pharyngeal dilator muscles: II. Compartmentalization of the canine genioglossus muscle. *Anatomical Record* 2000; 260: 308-325.
  70. **Mu** L, Sanders I. Neuromuscular compartments and fiber-type regionalization in the human inferior pharyngeal constrictor muscle. *Anatomical Record* 2001; 264: 367-377.
  71. **Narici** MV, Binzoni T, Hiltbrand E, Fasel J, Terrier F, Cerretelli P. In vivo human gastrocnemius architecture with changing joint angle at rest and during graded isometric contraction. *Journal of Physiology* 1996; 496: 287-297.
  72. **Ortak** T, Uraloğlu M, Orbay H, Tekin F, Unlü RE, Sensöz O. Transfer of innervated split latissimus dorsi free musculocutaneous flap for flexion and extension of the fingers. *Annals of Plastic Surgery* 2006; 56: 443-446.
  73. **Pearse**, A. G. E. *Histochemistry – Theoretical and Applied*. Boston: Little 1961; Brown and Co.
  74. **Peng** M, Poukens V, da Silva Costa RM, Yoo L, Tychsen L, Demer JL. Compartmentalized innervation of primate lateral rectus muscle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010; 51: 4612-4617.
  75. **Pereira** BP, Prem Kumar V, Lim AY, Tan JA, Tan BL. Properties of the two neuromuscular compartments in a split bipennate muscle. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22: 1325-1330.
  76. **Pfeiffer** G, Friede RL. The localization of axon branchings in two muscle nerves of the rat. A contribution to motor unit topography. *Anatomy and Embryology* 1985; 172: 177-182.
  77. **Pickering** M, Jones JF. The diaphragm: two physiological muscles in one. *Journal of Anatomy* 2002; 201:305-312.
  78. **Powers** RK, Binder MD. Summation of motor unit tensions in the tibialis posterior muscle of the cat under isometric and nonisometric conditions. *Journal of Neurophysiology* 1991; 66: 1838-1846.
  79. **Rafuse** VF, Gordon T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. I. comparisons of the capacity for regenerating nerves to form enlarged motor units after extensive peripheral nerve injuries. *Journal of Neurophysiology* 1996; 75: 268-281.
  80. **Reesink** HL, Hermanson JW, Cheetham J, Mu L, Mitchell LM, Soderholm LV, Ducharme NG. Anatomic and neuromuscular characterisation of the equine cricothyroid muscle. *Equine Veterinary Journal* 2013; 45:630-636.

81. **Reilly** KT, Nordstrom MA, Schieber MH. Short-term synchronization between motor units in different functional subdivisions of the human flexor digitorum profundus muscle. *Journal of Neurophysiology* 2004; 92: 734-742.
82. **Richmond** FJ, MacGillis DR, Scott DA. Muscle fiber compartmentalization in cat splenius muscles. *Journal of Neurophysiology* 1985; 53: 868-885.
83. **Romanes** GJ. The motor cell columns of the lumbo-sacral spinal cord of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 1951; 94: 313-363.
84. **Sandercock** TG. Nonlinear summation of force in cat soleus muscle results primarily from stretch of the common-elastic elements. *Journal of Applied Physiology* 2000; 89: 2206-2214.
85. **Sandercock** TG. Nonlinear summation of force in cat tibialis anterior: a muscle with intrafascicularly terminating fibers. *Journal of Applied Physiology* 2003; 94: 1955-1963.
86. **Sandercock** TG, Maas H. Force summation between muscles: are muscles independent actuators? *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2009; 41: 184-190.
87. **Sanders** I, Wu BL, Mu L, Biller HF. The innervation of the human posterior cricoarytenoid muscle: evidence for at least two neuromuscular compartments. *Laryngoscope* 1994; 104: 880-884.
88. **Segal** RL. Neuromuscular compartments in the human biceps brachii muscle. *Neuroscience Letters* 1992; 140: 98-102.
89. **Sharrard** WJ. The segmental innervation of the lower limb muscles in man. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1964; 35: 106-122.
90. **Sherrington** CS. Remarks on some aspects of reflex inhibition. *Proceedings of the Royal Society London* 1925; 97: 519-545.
91. **Stein** JM, Padykula HA. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *American Journal of Anatomy* 1962; 110: 103-123.
92. **Tötösy de Zepetnek** JE, Zung HV, Erdebil S, Gordon T. Motor-unit categorization based on contractile and histochemical properties: a glycogen depletion analysis of normal and reinnervated rat tibialis anterior muscle. *Journal of Neurophysiology* 1992 ; 67: 1404-1415.
93. **Weeks** OI, English AW. Compartmentalization of the cat lateral gastrocnemius motor nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 1985; 235: 255-267.
94. **Weeks** OI, English AW. Cat triceps surae motor nuclei are organized topologically. *Experimental Neurology* 1987; 96: 163-177.
95. **Widmer** CG, Carrasco DI, English AW. Differential activation of neuromuscular compartments in the rabbit masseter muscle during different oral behaviors. *Experimental Brain Research* 2003; 150: 297-307.
96. **Winges** SA, Santello M. Common input to motor units of digit flexors during multi-digit grasping. *Journal of Neurophysiology* 2004; 92: 3210-3220.
97. **van Eijden** TM, Turkawski SJ. Morphology and physiology of masticatory muscle motor units. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2001; 12: 76-91.

98. **Vanden Noven S**, Gardiner PF, Seburn KL. Motoneurons innervating two regions of rat medial gastrocnemius muscle with differing contractile and histochemical properties. *Acta Anatomica* 1994; 150: 282-293.
99. **Xie P**, Jiang Y, Zhang X, Yang S. The study of intramuscular nerve distribution patterns and relative spindle abundance of the thenar and hypothenar muscles in human hand. *PLoS One* 2012; 7: e51538.
100. **Yu DZ**, Liu AT, Dang RS, Zhang CS, Zhang JL, Chen G, Yi J, Han T, Jiang H. Intramuscular innervations of muscle flaps that are commonly used in clinical settings. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2010; 32: 637-646.
101. **Zenker W**, Sandoz PA, Neuhuber W. The distribution of anterogradely labeled I-IV primary afferents in histochemically defined compartments of the rat's sternomastoid muscle. *Anatomy and Embryology* 1988; 177: 235-243.
102. **Zuurbier CJ**, Huijing PA. Influence of muscle geometry on shortening speed of fibre, aponeurosis and muscle. *Journal of Biomechanics* 1992; 25: 1017-1026.
103. **Zuurbier CJ**, Huijing PA. Changes in geometry of actively shortening unipennate rat gastrocnemius muscle. *Journal of Morphology* 1993; 218: 167-180.