

Tomaž Smrkolj¹

Morfometrična analiza sinaptičnih jedrnih skupkov v posamičnih vlaknih hitre in počasne skeletne mišice²

A Morphometric Analysis of Synaptic Nuclear Clusters in Isolated Fibers of Fast and Slow Skeletal Muscle²

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mišica skeletna – anatomija in histologija, živčno-mišični stik, celično jedro, mišična vlakna počasna, mišična vlakna hitra, mikroskopija konfokalna, podgane

V področju živčno-mišičnega stika prečno progastega mišičnega vlakna pri sesalcih so jedra bolj zgoščena kot izvensinaptično. Počasna skeletna mišična vlakna so elektromehanično aktivna večji del časa kot hitra vlakna in so tako tudi vzorci frekvenc prenesenih akcijskih potencialov pri obeh tipih vlaken različni. Ta razlika med tipi vlaken bi se lahko odrazila tudi v različni razporeditvi mišičnih jeder in Schwannovih celic v sinaptičnem področju, kar do zdaj še ni bilo raziskano. Postavili smo naslednje hipoteze: 1. število mišičnih jeder v sinaptičnem skupku je v počasnem skeletnem mišičnem vlaknu značilno večje kot v hitrem vlaknu; 2. število Schwannovih celic v področju živčno-mišičnega stika, ki ga lahko ugotovimo tako, da preštejemo njihova jedra, je premosorazmerno s površino živčno-mišičnega stika; 3. maksimalna razdalja, do katere znotraj mišičnega vlakna še sežejo vplivi živčnih trofičnih dejavnikov, je v hitrih in počasnih skeletnih mišičnih vlaknih enaka.

V posamičnih skeletnih mišičnih vlaknih, ki smo jih izolirali iz *m. extensor digitorum longus* (hitra vlakna) in *m. soleus* (počasna vlakna), smo obarvali jedra s fluorescenčnim barvilom »SYTOX zeleno«. Živčno-mišični stik smo v teh vlaknih obarvali z α -bungarotoksinom, označenim z rodaminom. Ustrezna morfometrična merjenja razporejenosti jeder smo opravili na konfokalnem mikroskopu.

Dobljeni rezultati so nas pripeljali do naslednjih zaključkov: 1. v sinaptičnem jedrnem skupku odraslega počasnega skeletnega mišičnega vlakna je $7,15 \pm 2,37$ ($n = 20$) mišičnih jeder, medtem ko je v sinaptičnem jedrnem skupku hitrega vlakna teh jeder $4,60 \pm 0,75$ ($n = 20$). Ta razlika je statistično značilna ($p < 0,05$, neparni Studentov T-test). 2. korelacija med sinaptično površino živčno-mišičnega stika in številom jeder, ki pripadajo Schwannovim celicam, je bila v hitrem vlaknu višja ($KK = 0,4$) kot v počasnem ($KK = 0,07$), a po naši oceni še vedno premajhna za potrditev naše druge hipoteze. 3. Maksimalna razdalja v mišičnem vlaknu, do katere so še vidni znaki delovanja živčnih trofičnih dejavnikov, in ki smo jo ocenili z merjenjem razdalje med robom živčno-mišičnega stika in prvim zunajsinsinaptičnim jedrom, znaša za hitra skeletna mišična vlakna $25,5 \pm 9,3 \mu\text{m}$ ($n = 20$), za počasna pa $26,9 \pm 7,4 \mu\text{m}$ ($n = 20$). Med obema razdaljama ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$; Studentov T-test).

¹ Tomaž Smrkolj, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Objavljeno delo je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado študentom za leto 2000.

ABSTRACT

KEYWORDS: muscle skeletal – anatomy and histology, neuromuscular junction, cell nucleus, muscle fibers fast-twitch, muscle fibers slow-twitch, microscopy confocal, rats

Myonuclei of mammalian skeletal muscle fibers are packed at much higher density in the neuromuscular junction region than in the extrajunctional parts of the fiber. Slow muscle fibers are electromechanically active for longer time periods than fast fibers and the frequency patterns of action potentials are different in both fiber types. This difference might reflect in the distribution of synaptic myonuclei and the arrangement of synaptic Schwann cells. Our hypotheses were: 1. The number of synaptic myonuclei is significantly higher in slow fibers than in fast fibers. 2. The number of synaptic Schwann cells determined by counting their nuclei is proportional to the neuromuscular junction area. 3. The reach of the influences of neural trophic factors in the skeletal muscle fibers does not differ in regard to the fiber type.

Nuclei in single muscle fibers of *m. extensor digitorum longus* (fast) and *m. soleus* (slow) were labelled with SYTOX green nuclear acid stain and the endplates with rhodamine-tagged α -bungarotoxin. Images obtained by confocal microscopy were morphometrically analysed.

There are $7,15 \pm 2,37$ ($n=20$) synaptic myonuclei in slow muscle fiber and $4,60 \pm 0,75$ ($n=20$) synaptic myonuclei in fast muscle fiber. The difference is significantly different ($p < 0,05$; Student's T-test), The correlation coefficient between the area of the neuromuscular junction and the number of Schwann cell nuclei was higher in fast fibers ($KK=0,4$) than in slow fibers ($KK=0,07$), but to our opinion still too low to confirm our second hypothesis; 3. Maximal distance of the action of neuronal trophic factors was estimated by measuring the distance between the border of the neuromuscular junction and the first extrasynaptic nucleus. It was found to be $25,5 \pm 9,3 \mu\text{m}$, ($n=20$) in fast fiber type and $26,9 \pm 7,4 \mu\text{m}$ ($n=20$) in slow fiber type and the difference was not statistically significant ($p > 0,05$; Student's T-test).

UVOD**Pomen sinaptičnega prevajanja signalov**

V evoluciji so večcelični organizmi pridobili zmožnost prenosa informacij iz enega v druge dele organizma, kar je omogočilo celicam in s tem celotnemu organizmu koordinirano delovanje. Za prenos informacij iz ene na drugo celico so se v evoluciji posamezni deli na površini celice specializirali za prenos in sprejem signala. Ko gre za komunikacijo med nevronom in njegovimi tarčnimi celicami, se taka specializirana struktura imenuje sinapsa. V sinapsi glede na smer prenosa informacij ločimo pred-sinaptično in posinaptično membrano. Kadar gre za sinaptično komunikacijo med končičem motonevrona in skeletnim mišičnim vlaknom, pravimo tej sinapsi živčno-mišični stik (ŽMS) ali tudi motorična ploščica.

Eno od osrednjih vprašanj, s katerimi se ukvarjajo sodobne nevrološke znanosti, so mehanizmi in procesi, ki uravnavajo morfološko

in funkcionalno specializacijo celic v sinaptičnem področju. Poznavanje teh mehanizmov je ključnega pomena ne le za razumevanje delovanja ŽMS in ostalih sinaps, ampak tudi za razumevanje njihove plastičnosti in vrste procesov, v katere je ta vpletena (spomin, učenje, itd). Zaradi eksperimentalne dostopnosti je ŽMS trenutno daleč najbolj preučena med vsemi sinapsami in večina današnjega znanja o sinaptični zgradbi in sinaptičnem prenosu je bila pridobljena prav na ŽMS.

Zgradba živčno-mišičnega stika

Osnovna zgradba ŽMS sledi zgradbi ostalih kemičnih sinaps. Tako končič motoričnega živca tvori predsintaptični del, skeletno mišično vlakno prispeva posinaptični del, med seboj pa ju ločuje sinaptična špranja. α -motorični nevron izhaja iz sprednjih rogov hrbtenjače. Njegov akson potuje po perifernem živcu, se v mišici razveji, njegovi razvejki pa oživčujejo posamezna skeletna mišična vlakna. Na površini mišičnega vlakna razvejani akson izgubi mielinsko ovojnico, končiče pa prekrijejo

Schwannove celice (1). ŽMS sestavljajo tri vrste celic: motorični nevron s svojim živčnim končičem, skeletno mišično vlakno in Schwannova celica, ki prekriva živčni končič. Med živčnim končičem in Schwannovo celico na eni in skeletnim mišičnim vlaknom na drugi strani je bazalna lamina, ki ima v področju ŽMS drugačno molekularno zgradbo kot izven ŽMS (2).

Podrobnejša molekularna zgradba in natančnejši molekularni mehanizmi prenosa, predvsem pa molekularni mehanizmi, ki uravnavajo sinaptogenezo ŽMS in njegovo plastičnost, se nam razkrivajo šele v zadnjem času. Novejše raziskovalne metode molekularne biologije, elektrofiziologije in kristalografije so razkrile izredno kompleksnost v molekularni zgradbi ŽMS. Znanih je že okrog 50 različnih molekul, ki veljajo kot specifične za ŽMS, tudi to število pa najbrž še ni dokončno (3–5). Glede funkcij posameznih molekul je odprta še vrsta vprašanj, eno od najpomembnejših pa je, po kakšnih mehanizmih se vse te različne molekule kopičijo in združujejo v strukturo ŽMS. V presinaptičnem delu ŽMS obstaja vrsta molekul, ki so povezane s sintezo, transportom in izločanjem acetilholina (ACh), ki je kemični prenašalec v ŽMS. Poleg tega so tu še napetostni kanalčki Ca^{2+} , encim holinacetil transferaza (ChAT) in komponente transportnega sistema za privzem holina, v zadnjem času pa se raziskave usmerjajo k molekulam, ki sodelujejo pri eksocitozi mehurčkov na presinaptični membrani (5, 6). Na posinaptični membrani se nahaja acetilholinski receptor (AChR) in vrsta drugih molekul, ki skrbijo za ustrezno strukturo ŽMS. Neposredno pod posinaptično membrano se nahaja skupek sinaptičnih jeder, ki so pod kontrolo ekspresijskih dejavnikov, ki jih izloča motorični nevron (4). Med presinaptično in posinaptično membrano je bazalna lamina, ki ima pomembno razvojno, strukturno in funkcijsko vlogo. Bazalna lamina v sinaptičnem področju se razlikuje od tiste v izvansinaptičnem področju. Sestavljajo jo molekule laminina, različnih tipov kolagena, pripetih molekul acetilholinesteraze (AChE) in nekaterih dejavnikov, ki se izločajo iz živčnega končiča, kot sta npr. ARIA (angl. *Acetylcholine Receptor Inducing Agent*) in agrin (angl. *agregation inducer*). V sinap-

tičnem področju najdemo tudi izoformni obliki laminina (laminin 4, laminin $\beta 1/\beta 2$ ali S-laminin) in nekatere oblike kolagena, heparansulfat proteoglikanov in S-entaktina, ki so visoko koncentrirane le v sinaptični bazalni lamini (5,6,8).

Prenos signala prek živčno-mišičnega stika

Proces prenosa signala iz živčnega vlakna na mišično vlakno poteka po naslednjem vrstnem redu:

- Signal potuje v obliki depolarizacijskega vala, ki mu pravimo akcijski potencial, skokovito po aksonu živčnega vlakna in depolarizira membrano živčnega končiča. Posledica depolarizacije je odprtje napetostno odvisnih kanalčkov Ca^{2+} in vdor Ca^{2+} v živčni končič. Zvišana koncentracija Ca^{2+} v končiču sproži zaporedje dogodkov, ki privedejo do lokaliziranega sproščanja ACh v sinaptično špranjo.
- ACh prosto difundira prek špranje in se veže na nikotinski AChR na površini membrane mišičnega vlakna. Zaradi vezave ACh na AChR se odprejo kationski kanalčki, ki so del AChR. Poveča se prepustnost membrane za Na^+ in K^+ , kar pomakne membranski potencial z njegove mirovne vrednosti proti vrednosti praga. To depolarizacijo imenujemo ekscitacijski posinaptični potencial (EPSP).
- Ko EPSP doseže vrednost praga, se z različnim časovnim potekom odprejo in zaprejo napetostni kanalčki Na^+ in K^+ , kar privede do nastanka akcijskega potenciala, ki se razširi vzdolž in v notranjost skeletnega mišičnega vlakna.

Generalizirana depolarizacija membrane mišičnega vlakna povzroči aktivacijo napetostno odvisnih kanalčkov Ca^{2+} v določenih regijah (T-tubuli) in aktivacijo kanalčkov Ca^{2+} v sarkoplazemskem retikulumu. Posledično zvišana koncentracija Ca^{2+} v citosolu mišičnega vlakna povzroči skrčenje vlakna (9).

Sinaptogeneza živčno-mišičnega stika

Nastanek ŽMS obsega mnogo stopenj, od diferenciacije motoričnih živcev in izraščanja

aksonov do tarčnih celic – skeletnih mišičnih vlaken, pa vse do specializacije in diferenciacije tako tarčne celice kot tudi aksona na mestu njunega stika. Tudi večina današnjega znanja o sinaptogenezi izvira prav iz preučevanja nastajanja ŽMS in prevladuje mnenje, da podobni mehanizmi verjetno veljajo tudi za druge sinapse v organizmu (3). V razvoju perifernega živčnega sistema pri človeku motorični živci izraščajo iz ventralnih rogov razvijajoče se hrbtenjače med šestim in desetim tednom razvoja. Aksoni rastejo proti miotomu, ki je mezodermalna struktura in v kateri poteka razvoj in diferenciacija mišičnine. Skeletno mišično vlakno, ki nastane v končni fazi tega diferencijskega procesa, je večjedrni sincicij, ki nastane s fuzijo prekurzor-skih celic – mononuklearnih mioblastov (10). Mioblasti izhajajo iz mezodermalnega dela embrija, od koder potujejo v različne dele telesa, kjer tvorijo miotome somitov. Tam se prenehajo deliti in preidejo v proces fuzije. Preživetje in nadaljnja diferenciacija mišičnih cevčic je odvisna od prisotnosti motoričnih živcev in oživčenja prek njihovih končičev (10, 11). Pri opisanem dogajanju v embrionalnem razvoju imajo po vsej verjetnosti pomembno vlogo tudi celice glije, zlasti Schwannove celice (12).

Ko se vzpostavi prvi stik med rastočim motoričnim živcem in diferencirajočo se mišično cevčico, pride do intenzivne izmenjave signalov med njima, kar omogoči nadaljnjo diferenciacijo in nastanek visoko specializirane strukture na tem stiku (2, 13). Mesto nastanka ŽMS ni vnaprej določeno. Pri vretenčarjih lahko ŽMS nastane na kateremkoli delu na površini mišice. Funkcionalni stik s šibkim živčno-mišičnim prenosom nastane že v zelo kratkem času, vendar je za nastanek zrele in polno funkcionalne sinapse potreben dodaten čas, ki je – odvisno od *species* – v rangu nekaj tednov (3). Dokončna diferenciacija ŽMS privede do eliminacije vseh razen enega od več stikov med živcem in mišičnim vlaknom, ki se vzpostavijo v začetnih fazah oživčenja. Sinaptogeneza obsega diferenciacijo predsinalptične in posinaptične membrane. Diferenciacija slednje je povezana z vrsto dogodkov, od katerih je najboljše preučeno zgoščevanje AChR v sinaptičnem področju in »up-regulacija« njihove ekspresije v sinaptič-

nih jedrih. V proces diferenciacije predsinalptične membrane pa sodi akumulacija molekul, specifičnih za živčni končič, povečanje učinkovitosti sproščanja ACh, inhibicija rasti aksona in nadaljnje modifikacije te membrane. Ti procesi so združeni z akumulacijo različnih molekul na mestu nastanka ŽMS (14, 15). Od vseh molekul, ki se akumulirajo v področju ŽMS, je najbolj preučena akumulacija AChR v posinaptični membrani, do katere pride po prvem stiku z motoričnim živcem, kar se pri podgani zgodi med 15. in 18. embrionalnim dnevom (16). Akumuliranje AChR je eden ključnih dogodkov v sinaptogenezi in je odločilnega pomena za normalno delovanje sinapse, ker le zadostna koncentracija AChR omogoča nastanek ekscitacijskega potenciala na posinaptični membrani mišičnega vlakna. AChR je sestavljen iz petih homolognih podenot, najdemo pa ga v dveh podoblikah: sinaptični in izvensinaptični, ki se razlikujeta v eni podenoti (17). Transkripcijo podenot AChR v sinaptičnem področju uravnava ARIA. To je 42kDa velika beljakovina, ki jo sintetizirajo in izločajo motorični živci in ki deluje prek ErbB-receptorjev, od katerih so ErbB2, ErbB3 in ErbB4 koncentrirani v posinaptični membrani.

Bazalna lamina verjetno vsebuje signale, ki so potrebni za sproženje sinaptogeneze ŽMS, kar so ugotovili pri študijah sinaptične diferenciacije regenerirajočega mišičnega vlakna (18, 19). V teh študijah so pokazali, da tudi po uničenju motoričnih živcev, in torej v njihovi odsotnosti, v skeletnem mišičnem vlaknu pride do koncentriranja AChR na mestu sinapse, vendar le ob prisotnosti nepoškodovane bazalne lamine na mestu prvotnega stika z motonevromom (20, 21). Na bazalno lamino se veže prek kolagenskega repa tudi asimetrična (A12) oblika AChE. Med diferenciacijo in sinaptogenezo v mišičnih celicah se ekspresija, oblike molekule in lokacija AChE spreminjata. Pred sinaptogenezo se nahaja AChE po vsej dolžini razvijajoče se mišične cevčice, takoj po vzpostavitvi prvega stika z motoričnim živcem pa se prične hitro nabirati na področju nastajajočega ŽMS, medtem ko v izvensinaptičnih predelih njena koncentracija pade (2, 22, 23). Večino AChE v ŽMS prispeva mišična celica, možno pa je, da del le-te prispeva tudi motorični ži-

vec (24). Lokalizacija in sinteza AChE v mišični cevčici je omejena na področje jedra, v katerih se prepisuje AChE mRNA (25). Ekspresija in sinteza sinaptičnih komponent med sinaptogenezo in po njej sta v veliki meri pod nadzorom dejavnikov, ki jih izloča motorični živec, ni pa še raziskano, do katere oddaljenosti od ŽMS sega ta regulacija.

Za nastanek funkcionalnih sinaps je po vsej verjetnosti zelo pomembno tudi sodelovanje drugih celic, zlasti celic glije. Njihova vloga je v usmerjanju motoričnih nevronov do cilja, preskrbovanju z ustreznimi preživetvenimi dejavniki ter zagotavljanju ustrezne strukturne podpore (26). Mielinizirajoče celice imajo pomembno vlogo pri vzpostavitvi ŽMS. Mielinizacija aksonov pospeši fosforilacijo živčnih filamentov, kar je pomembno za diferenciacijo in migracijo motoričnih živcev (27). Schwannove celice, ki so odgovorne za mielinizacijo aksonov v perifernem živčnem sistemu, pospešujejo zorenje na novo nastalih ŽMS-ov (28) in s tem omogočijo normalen živčno-mišični prenos (29). Tako Schwannove celice kot tudi astrociti v centralnem živčnem sistemu izločajo razne rastne in preživetvene dejavnike, ki so nujni za razvoj in preživetje motoričnih živcev (30), ravno tako pa je za njihovo preživetje nujno tudi to, da najdejo ustrezne tarčne celice (31, 32).

Morfometrične značilnosti razporeditve jeder in njihov vpliv na beljakovinsko sintezo

ŽMS sicer predstavlja najbolj raziskan model sinapse, vendar ga od drugih sinaps loči nekaj morfoloških posebnosti. Le v ŽMS se namreč tvorijo skupki jeder pod posinaptično membrano. Po eni od zadnjih ocen naj bi koncentracija jeder v sinaptičnem področju presegala koncentracijo jeder izvensinaptičnega področja za faktor 17 (33), vendar je verjetno to število v resnici še večje. Jedra v mišični cevčici niso zmožna mitotske delitve, zato je nastanek skupkov neizogibno povezan s premeščanjem obstoječih jeder znotraj mišične cevke (34). Število jeder, ki ga k skupku prispevajo Schwannove celice, še ni znano. Po nekaterih podatkih naj bi šlo za eno samo jedro (35). Število Schwannovih celic naj bi po drugih avtorjih bilo odvisno od starosti poskusne živali. Ko so preučevali *m. soleus* podgane,

so 7 dni po rojstvu našli eno do dve Schwannovi celici na ŽMS, po 28 dneh pa že tri ali štiri celice na ŽMS (36).

Večjedrna zgradba mišičnega vlakna nudi dodatne načine regulacije beljakovinske ekspresije, saj različna razporeditev jeder, skupaj s kompartmentalizacijo citoplazme mišičnega vlakna, predstavlja področno variabilnost prisotnosti in preko drugih dejavnikov tudi ekspresije določenih genov (33). Tako se na primer različne podenote AChR ter AChE tvorijo le v sinaptičnem področju, ekspresije teh genov v ostalem delu mišice pa ni oziroma je zelo majhna. Z metodo *in situ* hibridizacije so prikazali, da so mRNA za AChE prisotne do oddaljenosti 10 μ m od središča jedra (37). Koncept kompartmentalizacije so razširili v koncept jedrnih domen, kjer vsakemu jedru v skupku pripada določen del citoplazme in organelov, ki sodelujejo v beljakovinski sintezi. Kljub višji koncentraciji jeder pa prisotnost za sinapso značilnih beljakovin samo v predelu sinapse ni posledica zgolj jedrne razporeditve, temveč tudi za sinaptična jedra značilne sinteze sinaptičnih beljakovin (2). Med dejavnike, ki bi lahko prispevali k ekspresiji teh genov v sinaptičnem predelu, štejejo nekatere molekule v sinaptični bazalni lamini ter krčenje same mišice (38).

Jedra pa niso edini celični organeli, katerih koncentracija se razlikuje v sinaptičnem in izvensinaptičnem področju. V poskusih, kjer so merili aktivnost mitohondrijskega encima sukcinatne dehidrogenaze v sinaptičnem in izvensinaptičnem področju skeletnega mišičnega vlakna, so odkrili 2- do 3- krat večjo aktivnost v sinaptičnem področju v primerjavi z izvensinaptičnim. Celotna aktivnost sukcinatne dehidrogenaze v ŽMS je izvirala iz posinaptične regije ŽMS. ATP, ki ga mitohondriji v ŽMS proizvajajo, je verjetno potreben za obnavljanje mirovnega membranskega potenciala, ki je ves čas moten z majhnimi ŽMS-potenciali iz motoričnega živca (39).

Morfološke in funkcionalne razlike med hitrimi in počasnimi mišičnimi vlakni

Izbrani mišiči se med seboj razlikujeta po funkciji. *M. extensor digitorum longus* je predstavniki fazičnega tipa mišic, ki se skrči za

krajši čas, medtem ko *m. soleus* sodeluje pri zagotavljanju normalne stoje in je tonična mišica. To se odraža tudi pri prevladujočem tipu mišičnih vlaken, ki jih mišici vsebujeta, vendar sta obe mišici kljub temu še vedno sestavljeni iz mešanice počasnih in hitrih mišičnih vlaken. Pullen je v svoji raziskavi pri soleusu našel 76,3 % vlaken tipa 1 (počasna vlakna) in 23,7 % tipa 2A (hitra vlakna). Pri *m. extensor digitorum longus* pa je našel 9,61 % vlaken tipa 1, 51,18 % tipa 2A in 39,34 % tipa 2B (hitra vlakna) (40).

Na ravni enega mišičnega vlakna se morfološke razlike med hitrim in počasnim vlaknom pokažejo v dolžinski gostoti mišičnih jeder tako sinaptično kot izvensinaptično, z večjo gostoto pri počasnem vlaknu. Fiziološke razlike pa so raziskovali v *in vivo* študijah proženja akcijskih potencialov mišičnih enot, kjer so opazovali frekvenco proženja, delež časa, ko je mišično vlakno aktivno, ter modulacije mišične sile. Na osnovi prožitvenih vzorcev so vlakna razdelili v tri kategorije. Hitra vlakna so razdeljena v dve kategoriji (IIa, IIb), ki sta aktivni 0,04–0,22 % in 1,6–5 % časa. Počasna vlakna (I) so aktivna 22–35 % časa. Frekvenca impulzov proženja za hitra vlakna je bila med 58 in 91 Hz, za počasna pa med 18 in 21 Hz, trajanje pa od 0,83 do 1,15 s v prvi kategoriji hitrih vlaken, od 59 do 141 s v drugi kategoriji hitrih vlaken in med 290 in 548 s pri počasnih vlaknih (41).

Hitrost krčenja mišičnega vlakna je odvisna od aktivnosti miozinske ATPaze, povezana pa je tudi s prisotnostjo različnih oblik kontraktilnih beljakovin in encimov, ki vežejo kalcij znotraj sarkoplazemskega retikuluma. Razlike so biokemično dokazali pri težkih in lahkih verigah miozina, troponinih T, I in C, aktininih in beljakovini C.

Glede na izomero težke verige miozina delimo vlakna na 10 tipov, ki delno ustrezajo histokemični razdelitvi. Tako histokemično poznamo vlakna: I, super hitra ekstraokularna, IIa, IIb, IIx(d) in IIc. Razdelitev po težki verigi miozina pa vključuje: srčna α , srčna β , IIeom, IIa, IIb, IIx(d), embrionalna, neonatalna/perinatalna in počasna tonična vlakna. Koncentracija mioglobina in encimov za aerobni metabolizem je v mišicah s prevladujočim počasnim tipom vlaken (rdeče mišice) višja kot v mišicah, kjer prevladujejo hitra vlakna (bele mišice).

V diferenciranem vlaknu lahko s spremembo vzorca aktivacije, ki prihaja po motoričnem živcu, spremenimo tudi nabor kontraktilnih beljakovin in metaboličnih encimov in s tem tip vlakna. Presenetljivo je bilo odkritje, da do začetne diferenciacije ne pride na ta način in da ni odvisna od ožvčenja, temveč je vzorec na ne povsem razumljen način zapisan v sami mišici. Menijo, da sta ena ključnih dejavnikov položaj vlakna v mišici in čas nastanka vlakna (42).

Namen dela

Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali morfološke in funkcionalne razlike med hitrimi in počasnimi skeletnimi mišičnimi vlakni odsevajo tudi na ravni razporeditve mišičnih jeder v sinaptičnem področju. Ker razporeditev jeder v mišičnem sinciciju določa prav tako razporeditev genov, pa tudi nekaterih organelov (grobi endoplazemski retikulum, mitohondriji, Golgijev aparat), ki so v mišičnem sinciciju pridruženi mišičnim jedrom, gre pri tem za potencialno pomemben način uravnavanja beljakovinske ekspresije in energijske preskrbe. Po naših podatkih morfološka analiza razporeditev jeder v ŽM-področjih različnih tipov skeletnih mišičnih vlaken še ni bila opravljena. V okviru naše naloge bomo preizkusili naslednje hipoteze:

1. Število mišičnih jeder v sinaptičnem skupku je v počasnem skeletnem mišičnem vlaknu značilno večje kot v hitrem vlaknu.

Utemeljitev: Počasno skeletno mišično vlakno je aktivno okrog 30 % svojega časa, medtem ko je ta odstotek pri hitrem skeletnem mišičnem vlaknu manjši od 1. Oba tipa vlaken se razlikujeta tudi po vzorcu frekvenc akcijskih potencialov, ki jih prevajata. Večja aktivnost prenašanja AP v sinaptičnem področju zahteva večjo preskrbo z energijo in nemara tudi živahnejšo beljakovinsko sintezo, za to pa bi lahko poskrbelo večje število jeder in njim pridruženih mitohondrijev.

2. Število Schwannovih celic v področju živčno-mišičnega stika, ki ga lahko ugotovimo tako, da preštejemo njihova jedra, je premo sorazmerno s površino živčno-mišičnega stika.

Utemeljitev: Obstaja vrsta podatkov, ki kažejo, da Schwannove celice aktivno sodelujejo pri razvoju in vzdrževanju sinaptičnih struk-

tur v ŽMS. Ob predpostavki, da je področje, ki ga oskrbuje ena Schwannova celica, omejeno, bi pričakovali, da bo število Schwannovih celic v sinaptičnem področju sorazmerno s površino tega področja. Ker v ŽMS površina posinaptične membrane ustreza površini predsinaptične, bi ob predpostavki, da vsaka Schwannova celica pokriva enak delež živčnega končiča, število Schwannovih celic moralo biti premosorazmerno s površino ŽMS.

3. Maksimalna razdalja, do katere znotraj mišičnega vlakna še sežejo vplivi živčnih trofičnih dejavnikov, je v hitrih in počasnih skeletnih mišičnih vlaknih enaka.

Utemeljitev: Živčni trofični dejavniki, kot so agrin ali ARIA, delujejo na skeletno mišično vlakno prek svojih receptorjev: receptor za agrin je MuSK, za ARIA pa podskupine receptorja ErbB. Oba receptorja sodita v družino tirozinskih kinaz. Za zdaj ni podatka o razdalji, do katere v sinaptičnem področju skeletnih mišičnih vlaken seže vpliv fosforiliranih produktov, ki nastanejo po vzdraženju omenjenih tirozinskokinaznih receptorjev. Ker, kot je do sedaj znano, oba mehanizma delujeta na enak način tako v hitrem kot tudi v počasnem skeletnem mišičnem vlaknu, ni razlogov, da bi bilo območje delovanja teh dejavnikov v različnih tipih vlaken različno.

METODE

Izolacija mišic

Programska skupina Medicinske fakultete »Molekularna nevrobiologija« v okviru katere je bila izdelana ta naloga, ima dovoljenje za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije (Dovoljenje št. 323-02-74/00). Vsi poskusi so bili izvedeni v skladu z določili tega dovoljenja.

Odrasle samičke podgan vrste Wistar smo žrtvovali z dovajanjem ogljikovega dioksida v škatlo z živaljo. Nato smo izrezali mišiči *m. extensor digitorum longus* ter *soleus* iz vsake zadnje tačke.

Fiksacija mišic

Izolirane mišice smo razpeli na silikatnem dnu posebej pripravljenih petrijevk in jih fiksirali s 4% paraformaldehidom v fosfatnem pufri

(30 minut). Fiksativ smo odstranili z dvakratnim spiranjem (po 15 minut) z istim pufrom.

Barvanje živčno-mišičnega stika in razrez mišic

ŽMS smo v izoliranih mišicah prikazali s histokemičnim barvanjem AChE s tiroholinsko metodo (43) pri sobni temperaturi. Mišice v petrijevki smo prelili z raztopino po Koelleju (50 nM CuSO₄, 20 mM glicin, 4,8 mM KCN v fosfatnem pufri; pH = 7,0), ki smo ji dodali acetilthioholin (1 mg/ml). Pod stereoskopsko lupo smo opazovali nastajanje histokemičnega produkta v področju z motoričnimi ploščicami. Ko so se ti predeli obarvali (okrog 5 minut), smo mišice sprali s fosfatnim pufrom. Pod stereoskopsko lupo smo izrezali področja mišic, ki so vsebovala ŽMS.

Barvanje s fluorescentnimi barvili

Skupke AChR v izrezanih koščkih mišic smo 30 minut barvali z α -bungarotoksinom, označenim s fluorescentnim barvilom rodaminom (Molecular Probes, Oregon, ZDA) v koncentraciji 1 μ g/ml. Koščke smo nato 2-krat sprali s fosfatnim pufrom, nakar je sledilo 30-minutno barvanje z barvilom »SYTOX zeleno« (Molecular Probes, Oregon, ZDA) v 0,5 μ M koncentraciji. Barvilo smo odstranili s ponovnim 2-kratnim spiranjem v fosfatnem pufri.

Izolacija posamičnih vlaken in njihov prenos na polilizinska objektna stekla

Pod stereoskopsko lupo smo z drobnimi pincetami izolirali posamezna vlakna iz prej omenjenih koščkov mišic ter jih položili na objektno stekelce. Vlakna smo vklopili v 70% glicerol in jih prekrili s krovnim stekelcem.

Ogled preparata in zajem slike

Za ogled preparata in zajem slike smo uporabili laserski konfokalni mikroskop proizvajalca Zeiss; tip Axiovert 100M, ki je povezan z osebnim računalnikom in ustreznim programom Zeiss LSM 510. Slike smo shranjevali v obliki računalniških datotek.

Analiza slike

Slike smo analizirali s pomočjo programa Zeiss LSM 510, in sicer tako, da smo najprej izdelali tridimenzionalno sliko mišičnega vlakna, nato pa uporabili orodja za merjenje dolžin in ploščin, ki jih ta program vsebuje. S temi orodji smo izmerili dimenzije jeder, ŽMS ter oddaljenosti jeder od ŽMS. Za površino ŽMS smo izmerili ploščino z α -bungarotoksinom obarvanega dela vlakna, število jeder nad ŽMS je predstavljalo število Schwannovih celic, jedra pod ŽMS oziroma v vlaknu pa smo šteli za sinaptična mišična jedra. Na osnovi izkušenj drugih avtorjev (44, 45) in na osnovi prejšnjih raziskav (33, 46) smo hitra in počasna mišična vlakna ločevali po gostoti izvensinaptičnih jeder.

REZULTATI

Razporeditev mišičnih jeder v izvensinaptičnih področjih in v sinaptičnih skupkih hitrega in počasnega skeletnega mišičnega vlakna

Z morfometrično analizo smo ugotovili, da je število mišičnih jeder v sinaptičnem skupku

počasnega skeletnega mišičnega vlakna za faktor 1,6 večje kot v sinaptičnem skupku hitrega skeletnega mišičnega vlakna. Za enak faktor je bila večja površina ŽMS v počasnem vlaknu. Obe razliki sta statistično pomembni (tabela 1). Upošteva se srednje vrednosti meritev smo ugotovili, da je razmerje med površino ŽMS in številom sinaptičnih mišičnih jeder (površina ŽMS, ki pripada enemu sinaptičnemu mišičnemu jedru) za počasno in hitro vlakno približno enako (tabela 1).

Gostota jeder v izvensinaptičnem področju, izražena kot število jeder v enoti volumna tega področja, je bila v počasnem vlaknu 2,6-krat večja kot v hitrem vlaknu. Povprečni volumen jedrne domene v izvensinaptičnem področju vlakna, ki je obraten gostoti jeder v tem področju vlakna, je večji v hitrem vlaknu kot v počasnem. Razlika je statistično pomembna. Pri obeh tipih vlaken je bila gostota jeder večja v sinaptičnem kot v izvensinaptičnem področju. Tako se pri obeh tipih vlaken statistično pomembno razlikujeta tudi povprečna volumna domen sinaptičnega in izvensinaptičnega jedra (tabela 2).

Tabela 1. Število sinaptičnih mišičnih jeder, površina živčno-mišičnega stika ter razmerje med površino ŽMS in številom sinaptičnih mišičnih jeder v hitrih in počasnih vlaknih. *p* – statistična vrednost *p* po Studentovem *t*-testu za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev, *n* = 20 pri vseh srednjih vrednostih.

Tip vlakna	Število sinaptičnih mišičnih jeder \pm S.O.	Površina ŽMS ($\mu\text{m}^2 \pm$ S.O.)	Razmerje površina živčno-mišičnega stika (μm^2 / število jeder \pm S.O.)
hitro	4,60 \pm 0,75	680 \pm 190	150 \pm 44
počasno	7,15 \pm 2,37	1060 \pm 446	155 \pm 65
<i>p</i>	0,000048	0,0012	0,818

Tabela 2. Volumni mišičnih jedrnih domen v ŽMS skupku in izven njega v hitrem in počasnem skeletnem mišičnem vlaknu ter njihovo razmerje. *p* – statistična vrednost *p* po Studentovem *T*-testu za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev, *n* = 20 za vse srednje vrednosti.

Tip vlakna	Volumen jedrne domene v skupku živčno-mišičnega stika ($\mu\text{m}^3 \pm$ S.O.)	Volumen jedrne domene izven skupka živčno-mišičnega stika ($\mu\text{m}^3 \pm$ S.O.)	Razmerje jedrnih domen v skupku in: izven skupka živčno-mišičnega stika \pm S.O.
hitro	632 \pm 180	20583 \pm 5781	34,5 \pm 11,6
počasno	508 \pm 258	8055 \pm 1782	20,9 \pm 15,4
<i>p</i>	0,087	manj kot 0,000001	0,003

Razporejenost jeder Schwannovih celic v sinaptičnih skupkih hitrega in počasnega skeletnega mišičnega vlakna

Srednja vrednost števila jeder Schwannovih celic se od srednje vrednosti števila sinaptičnih mišičnih jeder v povprečju razlikuje za 0,2 pri hitrih vlaknih in za 0,1 pri počasnih. S Pearsonovim korelacijskim testom smo za ti dve vrednosti dobili tudi srednje visoke korelacijske koeficiente tako pri počasnih (70 %) kot pri hitrih (47 %) vlaknih. Kljub enakemu razmerju povprečnih vrednosti med številom sinaptičnih mišičnih jeder in površino ŽMS v hitrih in počasnih vlaknih so korelacijski količniki med površino ŽMS in številom sinaptičnih mišičnih jeder ter ŽMS in številom Schwannovih celic nižji (tabela 3).

Območje delovanja živčnih trofičnih dejavnikov

Oddaljenost od roba ŽMS do prvega jedra, ki po morfometričnih merilih ustreza definiciji izvnsinaptičnega jedra, je bila tako v hitrem kot v počasnem vlaknu skoraj enaka. Pri hitrih vlaknih je znašala ta razdalja $25,5 \pm 9,3 \mu\text{m}$, pri počasnih pa $26,9 \pm 7,4 \mu\text{m}$. Po Studentovem t-testu se ti srednji vrednosti nista statistično pomembno razlikovali ($p = 0,60$, $n = 20$).

RAZPRAVLJANJE

Konfokalno mikroskopiranje ŽMS v hitrem in počasnem skeletnem mišičnem vlaknu

Po izkušnjah, ki smo si jih pridobili pri izdelavi te naloge, čas za zajem slike s konfokalnim

mikroskopom ne sme presegati 3 dni od izdelave preparata. Tretji dan je namreč difuzija barvila, s katerim smo barvali ŽMS, že dosegla take razsežnosti, da je bilo težko določiti mesto ŽMS na osnovi intenzivnejšega rdečega obarvanja. Razlik v obarvanju med ŽMS, mišičnim vlaknom in celo ozadjem preparata neredko ni bilo mogoče izboljšati niti s prilagajanjem osvetlitve in kontrasta v programu za zajem slik na konfokalnem mikroskopu. Nasprotno pa z barvilom »SYTOX zeleno«, ki obarva jedra, nismo imeli takih težav.

Emisijska spektra obeh fluorescentnih barvil, »SYTOXa zeleno« in rodamina, se pri nekaterih valovnih dolžinah prekrivata, s čimer lahko razložimo občasno rdeče obarvanje jeder, ki je bilo pridruženo rdečemu obarvanju ŽMS ter zelenemu obarvanju jeder. Težavi smo se uspeli delno izogniti s posamičnim vzbujanjem posameznega barvila, kar je uporabljeni konfokalni mikroskop omogočal. Pri zajemu slike je namreč izmenično osvetljeval isto točko preparata s svetlobo enega laserja in ne obeh hkrati, kar je omogočilo večje ločevanje med slikama, ki sta nastali s fluorescenčnimi signali iz obeh barvil.

Razporeditev mišičnih jeder v sinaptičnih skupkih in v izvnsinaptičnih področjih hitrega in počasnega skeletnega mišičnega vlakna

Naša predpostavka, da se hitro in počasno skeletno mišično vlakno razlikujeta po številu in razporeditvi mišičnih jeder, se je izkazala kot pravilna. Iz dobljenih podatkov je mogoče oceniti, da je v hitrem skeletnem mišičnem vlaknu gostota jeder v ŽMS 34,5-krat večja kot v preostali citoplazmi hitrega mišičnega vlakna.

Tabela 3. Korelacijski količniki, izračunani s Pearsonovim testom, med nekaterimi vrednostmi meritev v hitrih in počasnih vlaknih. KK1 – korelacijski količnik med številom sinaptičnih mišičnih jeder in številom jeder Schwannovih celic; KK2 – korelacijski količnik med številom jeder Schwannovih celic in površino živčno-mišičnega stika; KK3 – korelacijski količnik med številom sinaptičnih mišičnih jeder in površino živčno-mišičnega stika. $n = 20$ za vse srednje vrednosti, $p < 0,05$.

Tip vlakna	Število sinaptičnih mišičnih jeder \pm S.O.	Število jeder Schwannovih celic \pm S.O.	Površina živčno-mišičnega stika (μm^2) \pm S.O.	KK1	KK2	KK3
hitro	$4,60 \pm 0,75$	$4,80 \pm 1,24$	680 ± 190	0,47	0,40	0,33
počasno	$7,15 \pm 2,37$	$7,25 \pm 2,15$	1060 ± 446	0,70	0,07	0,16

Pri počasnem skeletnem mišičnem vlaknu je ta razlika manjša (20,9-krat večja gostota v ŽMS kot v izvensinaptičnem delu počasnega vlakna), in to na račun večje jedrne gostote v izvensinaptičnem področju pri teh vlaknih. S pomočjo rezultatov naših meritev je možno oceniti, da je povprečni volumen izvensinaptične jedrne domene v počasnem vlaknu $8055 \mu\text{m}^3$, v hitrem pa kar $20583 \mu\text{m}^3$, kar pomeni, da se ta dva volumna med seboj razlikujeta za 155 %. Volumen domene sinaptičnega jedra pa je po naših izračunih pri počasnem vlaknu manjši od volumna sinaptične domene pri hitrem, in sicer za okrog 24 %.

Gostota jeder v sinaptičnem skupku, ki smo jo izmerili v hitrem skeletnem mišičnem vlaknu, izoliranem iz *m. extensor digitorum longus*, je okrog dvakrat večja od gostote, ki je bila za sinaptični jedrni skupek v hitrem vlaknu *m. sternomastoideus* ugotovljena v eni od prejšnjih študij v našem laboratoriju (33). Za to razliko obstajata bržkone dva pomembna razloga. Za razliko od pričujoče raziskave, kjer smo uporabili konfokalno mikroskopijo, je bila v omenjeni raziskavi uporabljena navadna fluorescenčna mikroskopija, ki ni dopuščala natančne določitve volumna jedrnega skupka. Ta volumen je bil zato le grobo ocenjen, in to ob predpostavki, da so sinaptična jedra pod ŽMS razporejena v prostoru, ki ima obliko priskekanega stožca. V naši raziskavi smo s pomočjo tridimenzionalne računalniške rekonstrukcije zajete mikroskopske slike ugotovili, da se sinaptična jedra pod posinaptično površino ŽMS nahajajo v tanki plasti tik pod posinaptično membrano ŽMS, ki je debela zgolj za eno debelino jedra, kar znaša $4,26 \mu\text{m}$ v hitrem in $3,25 \mu\text{m}$ v počasnem vlaknu. Na ta način je izračunani volumen prostora skupka bistveno manjši, na ta račun pa smo ugotovili tudi večjo gostoto jeder v sinaptičnem skupku.

Naši rezultati kažejo, da je citoplazma v subsinaptičnem prostoru, kjer se nahajajo mišični jedrni skupki, zelo malo, zaradi česar bi lahko pričakovali zelo visoko koncentracijo genskih produktov tet jeder, vključno s pridruženimi organeli, kot so grobi endoplazemski retikulum, mitohondriji in Golgijev aparat. Tako stanje nedvomno vodi k večji tvorbi energije na volumsko enoto v tem področju. Da bi ugotovili, kakšne so ostale posledice takega stanja, bodo potrebne še dodatne raziskave.

Razporejenost jeder Schwannovih celic v sinaptičnih skupkih hitrega in počasnega skeletnega mišičnega vlakna

Za razliko od prejšnje študije (33), kjer metodološki pristop ni omogočal natančne določitve števila jeder Schwannovih celic v sinaptičnem skupku, smo s pomočjo konfokalne mikroskopije, ki je omogočala določitev lege jeder glede na posinaptično membrano ŽMS, lahko ugotovili, katera od njih pripadajo skeletnemu mišičnemu vlaknu in katera Schwannovim celicam.

Zanimiva ugotovitev naših raziskav je ujemanje števila jeder Schwannovih celic s številom mišičnih jeder v sinaptičnem skupku, ki smo jo ugotovili tako v hitrem kot tudi počasnem skeletnem mišičnem vlaknu. Ta ugotovitev govori v prid razmišljanju, da tako kot v področju ŽMS v skeletnem mišičnem vlaknu skrbijo za določena področja posinaptične membrane posamezna sinaptična mišična jedra, tudi posamezne Schwannove celice »oskrbujejo« podobno velika področja predsintaptičnega dela ŽMS. Tako razmišljanje pa postavljajo pod vprašaj relativno nizki korelacijski koeficienti, ki smo jih izračunali za razmerje med površino ŽMS in številom jeder Schwannovih celic, in ki so bili nižji v počasnem v primerjavi s hitrim skeletnim mišičnim vlaknom. Za dokončni odgovor bodo tako potrebni še dodatni eksperimenti.

Naše raziskave kažejo, da gre v zvezi z vlogo posameznih jeder oziroma celic za tri spremenljivke: površina ploščice ter število nad- in podsintaptičnih jeder, ki vplivajo druga na drugo. Površinsko večji ŽMS ima proporcionalno več nad- in podsintaptičnih jeder. Tu se postavlja vprašanje, katera od treh spremenljivk vpliva na drugi dve. Predlagamo naslednjo razlago. Trofični dejavniki, ki se sproščajo iz živčnega končiča in nembra tudi Schwannovih celic, vplivajo na število podsintaptičnih jeder, ta pa zaradi svojega večjega števila lahko sintetizirajo in nadzorujejo površinsko večjo ploščico.

Že v uvodu smo omenili dve raziskavi, ki sta dali različne odgovore glede števila Schwannovih celic v ŽMS. Naši rezultati so pokazali, da je v povprečju nadsintaptičnih jeder 4,8 (hitra vlakna) oziroma 7,25 (počasna vlakna). Uporabljena metoda nam ni omogočila,

da bi posebej lahko ugotovili število satelitnih celic v vlaknu in njim pripadajočih jeder. Verjetnost, da bi v naše analize zajeli tudi satelitne celice, pa je relativno majhna, saj le-te predstavljajo le majhen odstotek v primerjavi z ostalimi jedri. Obstajajo podatki, da pripada v hitrih mišicah 2,8 %, v počasnih pa 8 % vseh jeder satelitnim celicam (47).

Območje delovanja živčnih trofičnih dejavnikov

Trofični dejavniki, ki se izločajo iz predsinalptičnih končičev, povzročajo, kot smo zapisali v uvodu, koncentriranje sinaptičnih molekul v ŽMS (AChE, AChR in druge) in, vsaj v nekaterih primerih, njihovo pospešeno transkripcijo v sinaptičnih jedrih. Mišična jedra, na katera prek še ne natančno poznanih poti delujejo ti trofični dejavniki, se morfološko razlikujejo od izvensinaptičnih mišičnih jeder, vendar ni znano, kaj je vzrok te morfološke preobrazbe. Naši rezultati se ujemanjo s sedanjo predstavo o delovanju živčnih trofičnih dejavnikov, po kateri se mehanizmi delovanja teh dejavnikov ne razlikujejo glede na tip mišičnega vlakna (4, 5). Naši rezultati torej kažejo, da so razmere za difuzijo ali kak drugačen način transporta prenašalcev vplivov trofičnih dejavnikov v obeh tipih vlaken podobne.

Gledano v celoti naše raziskave govorijo v prid razmišljanju, da je razporejanje jeder v področju ŽMS eden od mehanizmov, ki določajo nastanek, vzdrževanje in delovanje te strukture. V tem pogledu ŽMS ni model za ostale sinapse v organizmu, saj pri njih posinaptične celice nimajo več jeder, ampak samo eno.

ZAKLJUČKI

1. Ugotovili smo, da je v sinaptičnem jedrnem skupku odraslega počasnega skeletnega mišičnega vlakna $7,15 \pm 2,37$ ($n = 20$) jeder. V sinaptičnem jedrnem skupku hitrega vlakna je $4,60 \pm 0,75$ ($n = 20$) jeder. Ta razlika je statistično značilna (neparni Studentov t-test), kar potrjuje našo prvo hipotezo, ki pravi, da je število mišičnih jeder v sinaptičnem skupku v počasnem skeletnem mišičnem vlaknu značilno večje kot v hitrem vlaknu.

2. Korelacija med sinaptično površino ŽMS in številom jeder, ki pripadajo Schwannovim celicam, je bila v hitrem vlaknu višja (KK 0,4) kot v počasnem (KK 0,07), a še vedno prenizka za potrditev naše druge hipoteze, po kateri naj bi bilo število jeder Schwannovih celic v področju ŽMS premo sorazmerno s površino ŽMS. Po drugi strani pa je v povprečju število jeder Schwannovih celic v področju ŽMS praktično enako številu mišičnih jeder v tem področju, in to pri obeh tipih vlaken. Tudi povprečne vrednosti površin, izraženih bodisi na eno jedro Schwannovih celic ali pa na eno jedro sinaptičnega skupka mišičnega vlakna, so skoraj identične, kar kaže, da določene korelacije med številom jeder v sinaptičnem skupku in površino ŽMS vendarle obstajajo.

3. Maksimalna razdalja, na kateri še delujejo živčni trofični dejavniki in ki smo jo ocenili z merjenjem razdalje med robom ŽMS in prvim zunajsinalptičnim jedrom, znaša za hitra skeletna mišična vlakna $25,5 \pm 9,3 \mu\text{m}$ ($n = 20$), za počasna pa $26,9 \pm 7,4 \mu\text{m}$ ($n = 20$). Med obema razdaljama ni statistično značilnih razlik (Studentov t-test), kar govori v prid naše tretje hipoteze, ki pravi, da se maksimalna razdalja, na kateri še delujejo živčni trofični dejavniki, ne razlikuje glede na tip skeletnega mišičnega vlakna.

Razporejanje jeder v področju ŽMS je eden od mehanizmov, ki določajo nastanek, vzdrževanje in delovanje te strukture, v čemer se ŽMS razlikuje od ostalih sinaps v organizmu, saj pri njih posinaptične celice nimajo več jeder, ampak samo eno.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Zoranu Grubiču, za dragocene nasvete, konstruktivne pogovore, pozorno in kritično branje tega dela.

Zahvala velja tudi somentorju, doc. dr. Marjanu Rupniku, za pomoč pri delu v konfokalni mikroskopiji ter za spodbudo.

Zahvaljujem se vsem iz laboratorija za pomoč, posebej pa mag. Tomažu Maršu in Zvonki Frelih za uvajanje v laboratorijsko delo.

LITERATURA

1. Kandel ER, Siegelbaum SA. Overview of synaptic transmission. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds. *Principles of neuronal science*. New York: Mc Graw-Hill; 2000. p. 188.
2. McMahan UJ, Sanes JR, Marshall LM. Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* 1978; 271: 172-4.
3. Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell* 1993; 72 (Suppl Neuron 10): 99-121.
4. Burden S. The formation of neuromuscular junction. *Genes Dev* 1998; 12: 133-48.
5. Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 389-442.
6. Engel AG. The Neuromuscular Junction. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 261-302.
7. Hall ZW. Laminin beta-2 (S-laminin): A new player at the synapse. *Science* 1995; 269: 362-3.
8. Carbonetto S, Lindenbaum M. The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 596-605.
9. Barres B in sod. Membrane Transport. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds. *Mol Biol Cell*. New York: Garland Publishing; 1994. pp. 721-4.
10. Hauschka SD. The embryonic origin of muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 3-73.
11. Ashby PR, Wilson SJ, Harris AJ. Formation of primary and secondary myotubes in aneural muscles in the mouse mutant peroneal muscular atrophy. *Dev Biol* 1993; 156: 519-28.
12. Son YJ, Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 1995; 14: 133-41.
13. Grinnell AD. Trophic interaction between nerve and muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 359-91.
14. Wells DG, Fallon JR. Neuromuscular junctions: The state of the union. *Curr Biol* 1996; 6: 1073-5.
15. Ruegg M, Bixby JL. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 1998; 21: 22-7.
16. Apel ED, Merlie JP. Assembly of postsynaptic apparatus. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 62-7.
17. Lindstrom J. Acetylcholinereceptor: structure, function, synthesis, destruction, and antigenicity. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 585-606.
18. McMahan UJ. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1990; 55: 407-18.
19. Deyst KA, Jianyi M, Fallon JR. Agrin: Toward a molecular understanding of synapse regeneration. *Neurosurgery* 1995; 37: 71-7.
20. Reist NE, Werle MJ, McMahan UJ. Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junction. *Neuron* 1992; 8: 865-8.
21. Cohen I, Rimer M, Lomo T, McMahan UJ. Agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle fibers in vivo. *Mol Cell Neurosci* 1997; 9: 237-53.
22. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31-91.
23. Grubič Z, Miranda MF. Developmental expression of acetylcholinesterase in skeletal muscle. In: Quinn DM, ed. *Enzymes of the cholinesterase family*. New York: Plenum Press; 1995. pp. 37-43.
24. Anglister L. Acetylcholinesterase from the motor nerve terminal accumulates on the synaptic basal lamina of the myofiber. *J Cell Biol* 1991; 115: 755-64.
25. Rossi SG, Rotundo RL. Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus of origin. *J Cell Biol* 1992; 119: 1657-67.
26. DeLapeyriere O, Handerson CE. Motorneuron differentiation, survival and synaptogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 642-50.
27. Starr R, Attema B, De Vries GH, Monteiro MJ. Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination. *J Neurosci Res* 1996; 44: 328-37.
28. Chapron J, De La Porte S, Delepine L, Koenig J. Schwann cells modify expression of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 260-70.
29. Koenig J, De La Porte S, Chapron J. The Schwann cell at the neuromuscular junction. *J Physiol Paris* 1998; 92: 153-5.
30. Junger H, Varon S. Neurotrophin-4 (NT-4) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promote the survival of corticospinal motor neurons of neonatal rats in vitro. *Brain Res* 1997; 762: 56-60.
31. Wetts R, Vaughn JE. Differences in developmental cell death between somatic and autonomic motor neurons of rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1998; 396: 438-92.
32. Riethmacher D, Sonnenberg-Rietmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 1997; 389: 725-30.

33. Milanić T, Kunstelj A, Marš T, Grubič Z. Morphometric characteristics of myonuclear distribution in the normal and denervated fast rat muscle fiber. *Chem-Biol Interact* 1999; 119-120: 321-6.
34. Bruner JM, Bursztajn S. Acetylcholine receptor clusters are associated with nuclei in rat myotubes. *Dev Biol* 1986; 115: 35-43.
35. Fidzianska M. Development of the human neuromuscular junction. *J Neuropath Exp Neurol* 1980; 39: 606-15.
36. Hirata K, Zhou C, Nakamura K, Kawabuchi M. Postnatal development of Schwann cells at neuromuscular junctions, with special reference to synapse elimination. *J Neurocytol* 1997; 26: 799-809.
37. Tsim KWK, Greenberg I, Rimer M, Randall WR. Transcripts for the acetylcholine receptor and acetylcholinesterase show distribution differences in cultured chick muscle cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 1201-12.
38. Brosamle C, Kuffler DP. Rapid dispersal of clustered postsynaptic nuclei following dissociation of skeletal muscle fibers. *J Exp Biol* 1996; 199: 2359-67.
39. Jasmin BJ, Campbell RJ, Michel RN. Nerve dependent regulation of succinate dehydrogenase in junctional and extrajunctional compartments of rat muscle fibres. *J Physiol* 1995; 481.1: 155-64.
40. Pullen AH. The distribution and relative sizes of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat* 1977; 123: 467-86.
41. Hennig R, Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 1985; 314: 164-6.
42. Engel AG. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. New York: McGraw Hill; 1994. pp. 119-33.
43. Koelle GB, Friedenwald JS. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol* 1949; 70: 617-22.
44. Atherton GW, James NT. Stereological analysis of the number of nuclei in the skeletal muscle fibers. *Acta Anat* 1980; 337: 570-3.
45. Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Physiol* 1995; 95: 1969-75.
46. Batista T. Razporeditev jeder v področju motorične ploščice pri hitri in počasni mišični podgane. [diplomska naloga]. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo; 1997.
47. Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of rat. *Anat Rec* 1997; 248: 346-54.
48. Askans V, Engel WK, Alvarez RB. Fourteen newly recognized proteins at the human neuromuscular junctions and their nonjunctional accumulation in inclusion body myositis. *Ann NY Acad Sci* 1998; 841: 28-56.
49. Burden S. Synapse-specific gene expression. *Trends Genet* 1993; 9: 12-6.
50. Jasmin BJ, Lee RK, Rotundo RL. Compartmentalization of acetylcholinesterase mRNA and enzyme at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuron* 1993; 11: 467-77.
51. Jevšek M. Izvor acetilholinesteraze v živčno-mišičnem stiku sesalca [diplomsko delo]. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo; 2000.
52. Marš T. Človeška mišica oživčena in vitro – model za študij sinaptogeneze živčno-mišičnega stika. [magistersko delo]. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1999.
53. Nguyen PV, Marin L, Atwood HL. Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J Neurophysiol* 1997; 78: 281-94.
54. Brown GL, Dale HH, Feldberg W. Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and eserine. *J Physiol* 1936; 87: 394-424.

Prispelo 7.2.2001