

Urnvananje acetilholinesteraze med ponovnim oživčenjem skeletne mišice*

Regulation of acetylcholinesterase during reinnervation of skeletal muscle

Janez Toplišek**

Deskriptorji
mišična denervacija
živec regeneracija
acetilholinesteraza

Descriptors
muscle denervation
nerve regeneration
acetylcholinesterase

Izvieček. V mišičnem vlaknu se urnvananje tvorbe makromolekul motorične ploščice spreminja med ontogenetskim razvojem. Za nezrele postnatalne mišice podgane je značilno, da se nesimetrične molekularne oblike acetilholinesteraze (AChE) in molekule acetilholinskega receptorja (AChR) sintetizirajo tudi izven motoričnih ploščic. Izven ploščic se sinteza AChR zavre v prvem tednu, sinteza nesimetričnih oblik AChE pa v četrtem tednu postnatalnega razvoja. Po denervaciji zrele mišice pride v izvenploščičnih predelih do ponovne tvorbe in vgrajevanja AChR, ne pa tudi nesimetričnih oblik AChE. Domnevali smo, da mišica za to morda potrebuje ponovno oživčenje. Molekularne oblike AChE smo ločevali po hitrosti sedimentacije v linearnem saharoznem gradientu. Prehodno denervacijo smo dosegli s pretisnjenjem ishialdičnega živca. Nerabo mišice smo povzročili z imobilizacijo sklepov na zadnji okončini, začasno paralizo pa z α -bungarotoksinom. Reinervacija počasne mišice soleus povzroči prehodno močno povečanje aktivnosti nesimetrične oblike AChE 16S v izvenploščičnih predelih, kar ustreza vrnitvi mišice v nezrelo postnatalno stanje. Začasna paraliza zaradi blokade AChR, ki ji sledi reaktivacija mišice, ne sproži takega dogajanja. Za vzdrževanje nezrelega stanja je nujna stalna prisotnost oživčenja mišice. Tonični vzorec proženja motoričnega živca ni odločilen za ta pojav. Hitra mišica ekstensor digitorum longus se med reinervacijo ne vrne v nezrelo stanje. Opažena razlika med hitro in počasno mišico verjetno temelji na genetsko pogojeni, intrinzični razliki med mišicama.

Abstract. In a muscle fibre, regulation of synthesis of motor endplate macromolecules changes during ontogenetic development. Immature early postnatal muscles of rat can synthesize the asymmetric forms of acetylcholinesterase (AChE) and the molecules of acetylcholine receptor (AChR) also in the endplate free regions. Synthesis of AChR in the endplate free regions is suppressed by the end of the first week, and synthesis of the asymmetric forms of AChE by the fourth week of postnatal development. After denervation of a mature muscle, synthesis of AChR, but not of the asymmetric forms of AChE, is restored in its endplate free regions. Therefore, we assumed that the muscle must be reinnervated. Molecular forms of AChE were separated by velocity sedimentation in linear sucrose gradients. Temporary denervation was achieved by crush lesion to the sciatic nerve. Disuse of the muscle was produced by immobilisation of hind leg joints, while transitory paralysis was induced by α -bungarotoxin administrating. Activity of the asymmetric AChE forms in the endplate free regions was transiently greatly increased by reinnervation of the slow soleus muscle – the muscle reverted to immature postnatal-like state. Transient paralysis of solens muscle due to AChR blockade, followed by reactivation of the muscle, did not trigger that event. The maintenance of immature state requires permanent innervation. Tonic pattern of motor nerve firing is not crucial for this phenomenon to occur. The fast extensor digitorum longus muscle did not return to immature state after reinnervation. The observed difference between fast and slow muscles is probably based on the intrinsic, i.e. genetic, difference between the two types of muscles.

*Objavljeno je delo, ki je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado v letu 1993.

**Janez Toplišek, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Zaloška 4, 61105 Ljubljana

Uvod

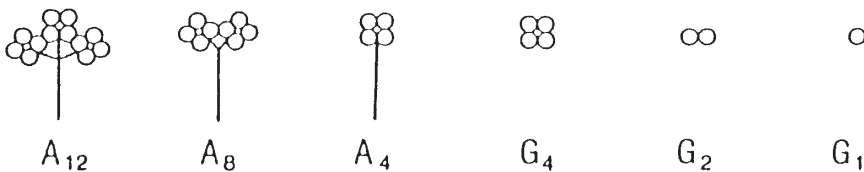
Živčno-mišični stik (motorična ploščica) je visoko specializirana struktura, ki jo sestavljajo presinaptični končič motoričnega nevrona, postsinaptična membrana mišične celice in sinaptična špranja (20–50 nm) z bazalno lamino (1). Delovanje živčno-mišičnega stika – hiter in zanesljiv prenos vzburjenja z živca na mišico – omogočajo številne makromolekule (acetilholinski receptor (AChR), acetilholinesteraza (AChE), holin-acetiltransferaza in druge), ki so nakopičene v posameznih strukturah živčno-mišičnega stika.

AChE je ključen encim pri prenosu vzburjenja v živčno-mišičnem stiku, ker s hitro razgradnjo acetilholina ACh pospeši repolarizacijo postsinaptične membrane, s čimer omogoči prenos novega impulza takoj za predhodnim in tako visoko frekvenco draženja mišičnega vlakna (2). AChE se v živčno-mišičnem stiku nahaja v bazalni lamini v primarni in sekundarni sinaptični špranji, na postsinaptični membrani, nekaj pa je tudi pre-sinaptično ob živčnem končiču (3, 4). V zreli skeletni mišici je AChE izredno skoncentrirana v živčno-mišičnem stiku, kjer je njena koncentracija 10.000 do 20.000-krat večja kot v mišičnem vlaknu zunaj stika. Ker pa je prostornina sinaptične reže zelo majhna v primerjavi s prostornino celotnega mišičnega vlakna, je količinsko več AChE zunaj motoričnih ploščic kot v njih (5).

AChE je molekularno polimorfen encim (6, 7): v istem tkivu nastopa v več molekularnih oblikah. Le-te delimo v dve veliki skupini (glej tudi sliko 1):

- **oblike G** – globularne oblike, ki so razširjene vzdolž celotnega mišičnega vlakna (G1 monomer, G2 dimer, G4 tetramer) in
- **oblike A** – nesimetrične oblike (1, 2 ali 3 globularni tetrameri + kolagenski rep) v zrelih mišicah večine sesalcev so posebej značilne za živčno-mišični stik (8, 9) (A12, A8, A4 – številka pove število katalitičnih podenot na eni molekuli AChE).

Čeprav so nesimetrične oblike AChE močno skoncentrirane v motoričnih ploščicah, pa niso specifične za živčno-mišični stik. Pri podgani v zgodnjem postnatalnem razvoju najdemo visoko aktivnost teh oblik tudi v izvenploščičnih predelih mišic, v živčno-mišični stik pa se osredotočijo šele en mesec po rojstvu (10). Pri človeku je visoka aktivnost teh oblik ohranjena izven ploščic tudi v zrelih mišicah, kar je sicer izjema glede na druge proučevane sesalce (9, 11).



Slika 1. Shematičen prikaz molekularnih oblik AChE v tkivih vretenčarjev. Vsako molekularno obliko AChE lahko označimo tudi z njenim sedimentacijskim koeficientom: G1 = 4S, G2 = 6S, G4 = 10S; A4 = 8S, A8 = 13S, A12 = 16S; (vse vrednosti veljajo za podgano).

AChE v normalnih mišicah odrasle podgane – hitre in počasne mišice

Mišična vlakna sesalcev kažejo precejšnje raznovrstnost glede fizioloških in biokemičnih lastnosti (12, 13). Grobo jih lahko razdelimo v dve skupini: hitra (»fast twitching«, bela, tip II, večinoma glikolitična) in počasna (»slow twitching«, rdeča, tip I, večinoma oksidativna). Večina mišic vsebuje mešane populacije obeh vrst vlaken, nekatere mišice pa so glede tega bolj enotne. Pri podgani v mišici EDL (m. extensor digitorum longus) prevladujejo hitra vlakna tipa II, v mišici SOL (m. soleus) pa počasna tipa I (14). V počasni mišici SOL so motorične enote spodbujene tonično z dolgimi vlaki nizkofrekventnih impulzov, v hitri mišici EDL pa vzburjenje poteka fazično, s kratkotrajnimi izbruhi visokofrekventnih impulzov. Le-ti se pojavljajo redkeje kot pri mišici SOL, zato je celotno število impulzov na dan pri mišici SOL veliko večje kot pri EDL (15).

Vzorca molekularnih oblik AChE v normalnih zrelih mišicah EDL in SOL pri podgani se pomembno razlikujeta (16, 17). Posamezne molekularne oblike AChE lahko označimo tudi s sedimentacijskim koeficientom (S). Pri hitri mišici EDL močno prevladujejo globularne oblike (predvsem 4S, zelo izražena je tudi oblika 10S), pri počasni mišici SOL pa kažejo nesimetrične oblike AChE (16S in 13S) približno enako aktivnost kot globularne oblike. Posebej očitna je razlika, če primerjamo razmerje med nesimetrično obliko 13S in globularnim tetramerom 10S. Razmerje je pri SOL močno v prid obliki 13S, pri EDL pa v prid obliki AChE 10S (18).

Glede AChE v motoričnih ploščicah med obema mišicama ni kakovostnih razlik. Nesimetrične oblike AChE se tam kopičijo pri obeh mišicah. Pomembne razlike pa so opazili v izvenploščičnih predelih. Nesimetrične oblike so v teh predelih prisotne v mišici SOL (oblika 13S prevlada nad 16S), v mišici EDL pa jih izven motoričnih ploščic praktično ni (17).

AChE v denervirani in embrionalni mišici

Razlike glede uravnavanja AChE med hitrimi in počasnimi mišicami ostanejo tudi po denervaciji. V SOL v izvenploščičnih predelih aktivnosti vseh molekularnih oblik AChE enakomerno pade, v EDL pa ostane aktivnost oblik 10S sprva še visoka. Po sedmih tednih denervacije se v SOL izven ploščic aktivnost nesimetričnih oblik AChE zopet dvigne, v EDL pa ostane nepomembna. V ploščičnih predelih obeh mišic aktivnost nesimetrične oblike AChE 16S po denervaciji hitro pade (19).

Odvisnost mišične AChE od motoričnega živca se vzpostavi že v embrionalnem obdobju. AChE se sicer pojavlja v mioblastih in mišičnih cevkah že pred vraščanjem živčnih končičev v mišične mase (20), za njeno kopičenje na ozkem področju sarkoleme pa je nujno oživčenje mišice (21, 22, 23). Ob rojstvu so si vzorci molekularnih oblik AChE pri hitrih in počasnih mišicah podgane podobni (24). Med 4. in 10. dnevom po rojstvu pa se kljub podobnemu, tedaj še fazičnemu vzorcu živčnega draženja (25) v obeh vrstah nezrelih mišic že pojavijo razlike v uravnavanju AChE: nesimetrični obliki AChE 13S in 16S v SOL porasteta mnogo bolj kot v EDL. Do konca prvega meseca po rojstvu aktivnost nesimetričnih oblik AChE v SOL sicer pade, vendar pa ostane delno prisotna tudi

izven ploščic. V EDL pa nesimetrične oblike AChE v področjih izven ploščic v tem obdobju izginejo (17).

AChR in denervacija mišice – vrnitev v nezrelo postnatalno stanje

Med embrionalnim razvojem so še pred oživčenjem v nezrelih mišičnih celicah prisotni tudi AChR (26). V prvem tednu postnatalnega razvoja se na mestih živčno-mišičnega stika konča kopičenje AChR (27). Vpliv živca na ta proces skušata razložiti dve hipotezi:

- agregacijo postsinaptičnih molekul naj bi sprožil »trofični dejavnik«, ki se izloča iz motonevrona. Eden od kandidatov za tak dejavnik je agrin. Agrin je protein zunajceličnega matriksa, natančneje bazalne lamine. Agrin izločajo mišične celice (28), najdemo pa ga tudi v motonevronih, ki ga verjetno izločajo na živčnih končičih (29). Analiza aminokislinskega zaporedja agrina je pokazala, da se njegov C terminal veže na agrinski receptor sarkoleme in sproži agregacijo agrinskega receptorja, AChR in AChE. Sinteza beljakovin za samo agregacijo ni potrebna, pač pa je nujna v fazi preoblikovanja citoskeleta in zunajceličnega matriksa. Drugi konec agrina – N terminal – služi za vezavo oz. rezervoar rastnih dejavnikov, ki lahko prispevajo k tvorbi in ohranjanju arhitekture sinapse na omejenem mestu stika živca in mišice (30, 31). V prid tej domnevi govori tudi ugotovitev, da pride v nezreli motorični ploščici po denervaciji do disperzije celotnega postsinaptičnega aparata (gube sarkoleme, AChR, AChE) v 2 do 3-kratni dolžini prvotne sinapse. V zreli mišici tega pojava ni opaziti, ker se je postsinaptična struktura očitno ustalila (32);
- hipoteza »stika in adhezije« predvideva, da zadošča sam stik živca in mišice, drugi dejavniki niso nujni (33). V kulturi mišičnih celic so agregacijo AChR povzročile celo nefiziološke pozitivno nabite kroglice lateksa (34).

Tudi po oživčenju embrionalnih mišic so AChR nekaj časa še vedno razporejeni v sarkolemi vzdolž vsega mišičnega vlakna, v prvem tednu po rojstvu (pri podgani) pa v izvenploščičnih predelih izginejo; ostanejo torej osredotočeni le v motorični ploščici (23, 27). Pri tej supresiji sinteze AChR izven motoričnih ploščic je odločilnega pomena živčno prožena mišična aktivnost (35). Po denervaciji zrele mišice odrasle živali se ta aktivnost prekine in AChR se zopet sintetizirajo in vgrajujejo v sarkolemo na področjih izven motoričnih ploščic (36). Mišica se na nek način povrne v »nezrelo embrionalno oz. postnatalno stanje«.

AChE v mišici med reinervacijo

Za podganje mišice je značilno, da po denervaciji aktivnost AChE v teh mišicah hitro pade, še posebej pa aktivnost nesimetričnih oblik AChE (8, 37). Aktivnost AChE (posebno nesimetričnih oblik) pa je v nezrelih mišicah embrionalnih in postnatalnih mišicah visoka. Zrela mišica se torej po denervaciji glede uravnavanja ne vrne v nezrelo postnatalno stanje, kot je to vidno pri uravnavanju AChR.

Zanimive spremembe v uravnavanju AChE pa nastanejo, če predhodni denervaciji sledi reinervacija mišice. V mišici SOL se od začetka reinervacije aktivnost vseh molekularnih oblik AChE hitro povečuje. Sprva je največji porast oblike 4S, po dveh tednih re-

inervacije pa prevladata obliki 16 in 13S. Celotna aktivnost AChE je 2,5-krat večja kot v kontrolni skupini. V naslednjih tednih aktivnost AChE pada. V mišici EDL je med reinervacijo porast oblike AChE 16S petkrat manjši kot pri mišici SOL, tudi aktivnost ostalih molekularnih oblik AChE se le počasi poveča (38). Avtorja sta pri raziskavi preučevala mišico kot celoto, torej nista ločila predelov z motoričnimi ploščicami od predelov brez njih, zato se nam je zdelo, da bi bilo prav to zanimivo podrobneje proučiti s stališča morebitne vrnitve mišice v nezrelo postnatalno stanje med reinervacijo.

Namen dela

Pričujoča raziskava ima namen z modelom reinervacije po začasni denervaciji (pretisnjenje perifernega živca) opazovati učinek oživčenja na uravnavanje AChE, predvsem njenih nesimetričnih oblik, v izvenploščičnih predelih hitrih in počasnih mišic.

Hipoteza: med procesom reinervacije po kratkotrajni denervaciji se mišica glede uravnavanja AChE povrne v nezrelo (embrionalno, postnatalno) stanje, v katerem se obnovi velika aktivnost nesimetričnih oblik AChE v izvenploščičnih predelih.

Če bi se izkazalo, da je hipoteza pravilna, bi nas posebej zanimalo, kako je uravnavanje nesimetričnih oblik acetilholinesteraze v izvenploščičnih predelih med obdobjem reinervacije odvisno od trajanja predhodne denervacije in od vzorca živčnega draženja mišice med reinervacijo, ki ga je mogoče spremeniti v razmerah mišične nerabe (disuse).

Pomembno bi bilo tudi vedeti, ali so spremembe uravnavanja AChE, ki nastajajo med reinervacijo mišice, neposredno odvisne od stalne prisotnosti živca ali pa jih živec samo sproži in nato tečejo neodvisno. Prav tako bi bilo zanimivo dognati, ali je sprememba uravnavanja nesimetričnih oblik AChE po začasni paralizi mišice (blokada AChR z α -bungarotoksinom) enaka kot po prehodni denervaciji.

Materiali in metode

Poskuse smo delali na belih podganah soja Wistar. Živali smo pred začetkom operacije omamili bodisi s pentobarbitalom (50 mg/kg i. p.) bodisi z mešanico Ketalarja® (60 mg/kg) in Rompuna® (8 mg/kg). Proučevali smo počasno mišico SOL in hitro mišico EDL iz odraslih živali (stare 2–3 mesece, težke 180–250 g) ter iz živali v postnatalnem obdobju (16 dni po rojstvu).

Kirurški postopki

Odrasle podgane smo razdelili v več skupin po 3 do 6 živali.

Proksimalna aksonotmeza (pretisnjenje živca)

Na eni strani smo na stegnu podgane izpreparirali ishiadični živec in ga za 30 sekund stisnili s šivalnikom z gladkimi prijemalnimi površinami. Kožno rano smo zaprli s sponkami in pustili žival okrevati. Eno skupino živali smo žrtvovali po 21 dneh, drugo pa po 35 dneh po pretisnjenju živca.

Distalno pretisnjenje živca

Izpreparirali smo mišico SOL in prikazali njen motorični živec. Le-tega smo s fino okulistično pinceto za 30 sekund stisnili tik ob vstopu živca v mišico. Rano smo oskrbeli kot zgoraj. Eno skupino živali smo žrtvovali 8. dan, drugo pa 15. dan po pretisnjenju živca.

Denervacija po reinervaciji

Tri tedne po proksimalnem pretisnjenju ishiadičnega živca smo le-tega ponovno izpreparirali in iz njega izrezali 5 mm dolg košček. Živali smo žrtvovali četrty dan po prerezanju ishiadičnega živca. Kot kontrola so nam služile živali, ki smo jih žrtvovali 25. dan po pretisnjenju ishiadičnega živca.

Imobilizacija

Pri kontrolni skupini smo živalim na eni strani imobilizirali skočni in kolenski sklep v srednjem položaju tako, da smo zabodli dve tanki podkožni injekcijski igli – spodnjo skozi petnico, zgornjo skozi distalno epifizo stegnenice – v golenico. Živali so po tej imobilizaciji okončino pri hoji uporabljale samo občasno in se pri tem opirale le na prste. Žrtvovali smo jih 8. dne po imobilizaciji okončin.

Pri drugi skupini živali smo najprej proksimalno pretisnili ishiadični živec, kot je zgoraj opisano, 11 dni kasneje smo imobilizirali skočni in golenski sklep z notranjo zatrditvijo, tako da je reinervacija mišice SOL potekala v imobilizirani okončini. Živali smo žrtvovali 21. dan po pretisnjenju živca.

Mišična paraliza

Od dr. G. Vrbove (University College, London) smo dobili silikonske trakce, v katerih je bil zamešan α -bungarotoksin (20 μ g/mg). Izpreparirali smo mišico SOL in omenjeni trakec vstavili tik ob to mišico na nasprotni strani vstopa živca, da le-tega ne bi poškodovali. S šivom smo zašili fascijo in površinske mišice goleni, da se trakec ni mogel več premikati, ter rano zaprli. V naslednjih 24-ih urah se je razvila paraliza mišic goleni, kar smo lahko opazili, ko je izginil refleks razpiranja prstov zadnje tačke. Prvi znaki obnavljanja refleksa so se pokazali 4. dan po vstavitvi trakca, 6. dan pa se ni več razlikoval od refleksa na zdravi strani. Takrat smo trakec odstranili, da ne bi povzročal mehaničnih okvar mišice. Živali smo žrtvovali 15. oz. 25. dan po vstavitvi trakca z α -bungarotoksinom.

Priprava mišičnih vzorcev

Živali smo žrtvovali iz zkrvavitvijo v etrovi omami. Obravnavane mišice smo izolirali, prerezali vzdolžno na pol in jih inkubirali 35 minut v Koellejevem histokemičnem mediju za prikaz AChE (pH 7) (39). Po tem času so se zaradi histokemične reakcije prikazale motorične ploščice v mišicah, tako da smo pod preparirnim mikroskopom lahko ločili predel brez motoričnih ploščic od predelov z njimi. Za analizo molekularnih oblik AChE smo izvenploščične predele iz 4–6 mišic združili v en vzorec. Molekularne oblike smo določili vsaj dvakrat, rezultati so bili dobro ponovljivi.

Analiza molekularnih oblik AChE

Molekularne oblike AChE smo določili z metodo ločevanja po hitrosti sedimentacije v linearnem saharoznem gradientu (40). Vzorce izvenploščičnih predelov mišic smo ročno homogenizirali v ledeni ekstrakcijski raztopini. Homogenate smo 30 minut centrifugirali pri 17000 obratih/min. Supernatantu smo dodali očiščeno katalazo (11,3S) za določanje sedimentacijskih koeficientov in ga nanесли na vrh saharoznega gradienta (5–20%). Gradiente smo nato 18,5 ur centrifugirali pri 36000 obratih/min pri 4°C. Po centrifugiranju smo prebodli dno kivete in s frakcioniranjem po kapljicah razdelili vsak gradient na 30 frakcij. Aktivnosti AChE v frakcijah smo določali po metodi Ellmana in sod. (41). Vzorce smo predinkubirali z inhibitorjem nespecifične holinesteraze (iso-OMPA) in dodali substrat – acetiltioholinov jodid (1 mM). Vzorce smo inkubirali 3,5 ure pri 25°C.

Slepe vzorce smo pripravili s 5 in z 20 % raztopino saharoze v ekstrakcijski raztopini. Spektrofotometrično izmerjenim vrednostim aktivnosti v vzorcih smo grafično odšteli vmesne aktivnosti slepih vzorcev in tako dobili aktivnosti, ki so posledica čiste hidrolize z AChE. S primerjavo položaja katalaze in vrhov aktivnosti AChE v gradientih smo določili sedimentacijske koeficiente posameznih oblik AChE in jih tako identificirali. Množino nesimetrične oblike AChE 16S smo določili kot površino pod ustreznim vrhom aktivnosti AChE v vzorcu molekularnih oblik AChE. Pri tem smo uporabili računalniško analizo s programom, ki je bil izdelan na Inštitutu za patološko fiziologijo in Inštitutu za fiziologijo Medicinske fakultete.

Rezultati

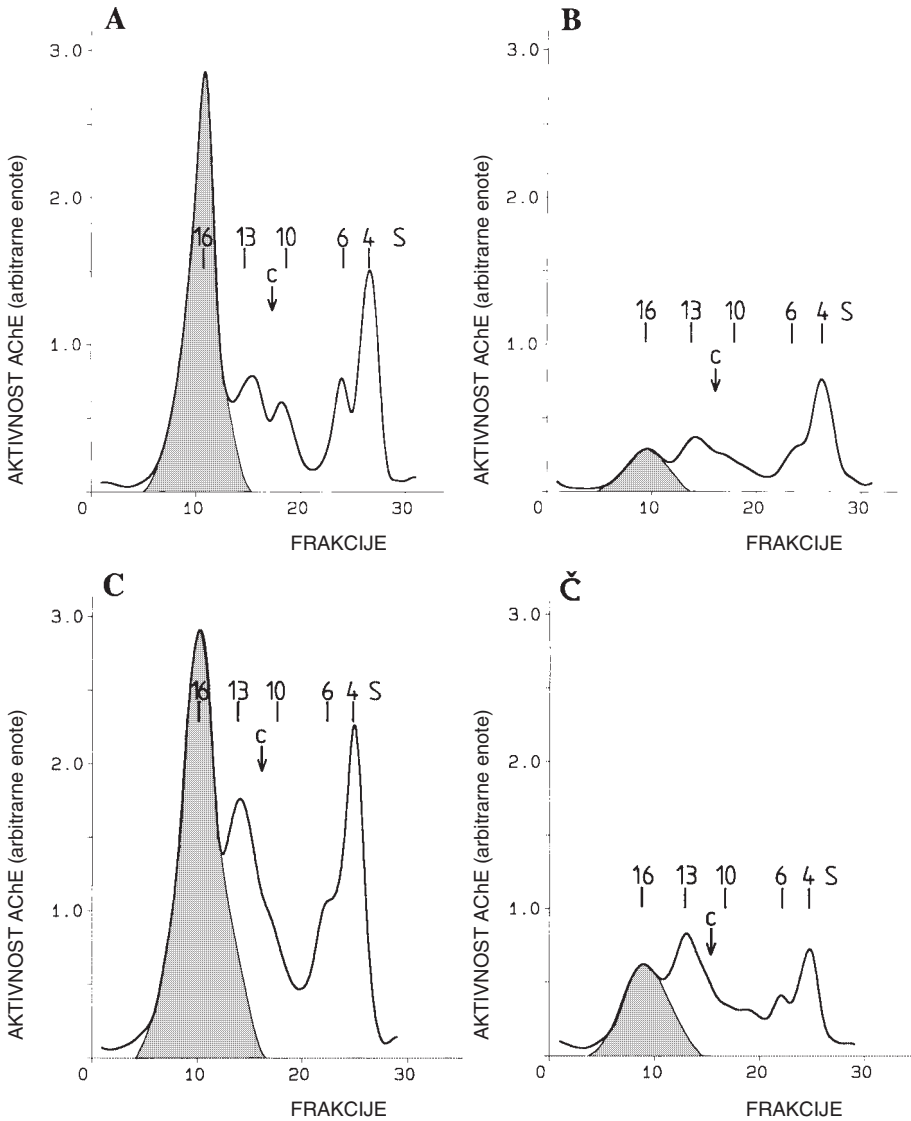
Uraevnanje AChE v počasni mišici soleus med reinervacijo

Molekularne oblike AChE smo analizirali le v tistih področjih mišice SOL, kjer ni motoričnih ploščic (t. j. izvenploščična AChE). V nezreli postnatalni mišici SOL je celotna aktivnost AChE višja kot v normalni, zreli mišici SOL. Med vsemi molekularnimi oblikami prevladuje oblika AChE 16S (slika 2a). Med dozorevanjem aktivnost vseh molekularnih oblik pade, še posebej aktivnost oblike 16S, ki pa še vedno ostaja jasno razvidna tudi v zreli mišici odraslih živali (slika 2b).

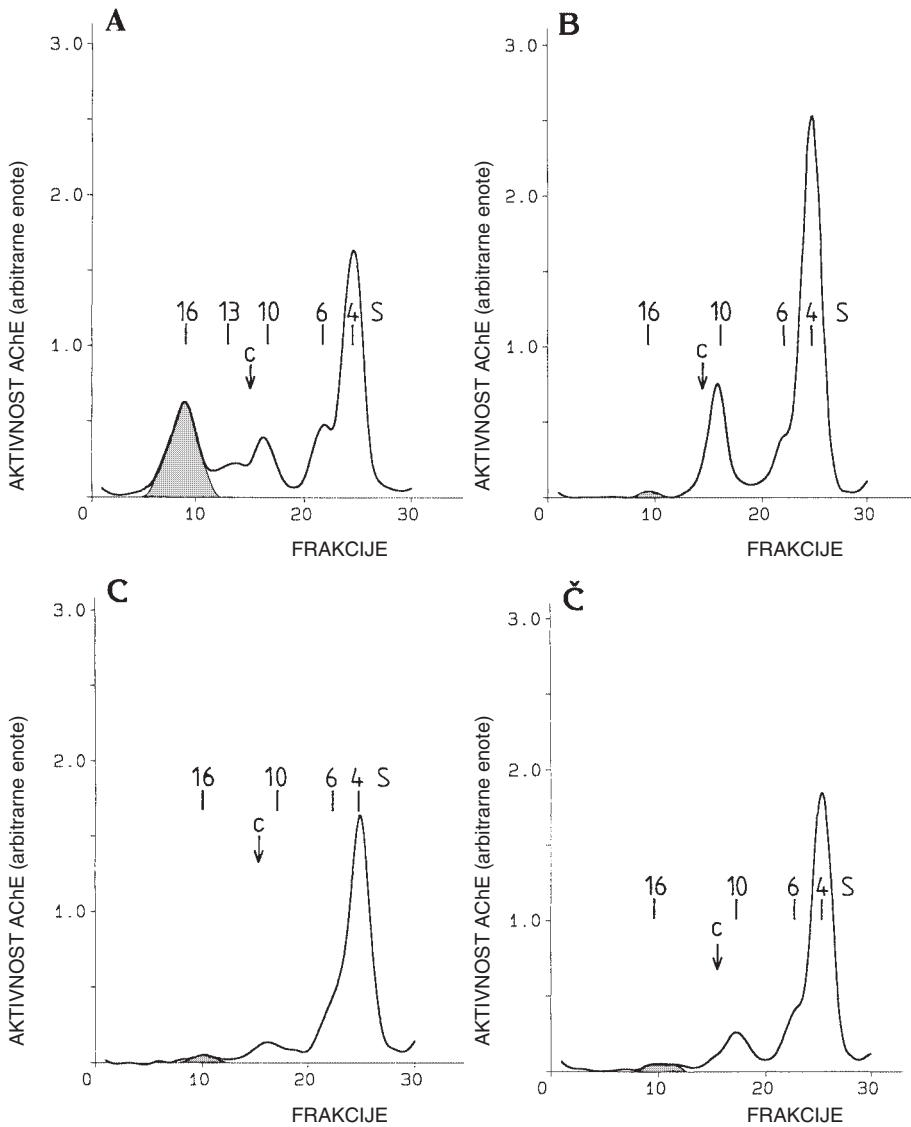
21. dan po pretisnjenju ishiadičnega živca (torej po prehodni denervaciji in reinervaciji) je bila celotna aktivnost AChE v mišici SOL izven motoričnih ploščic veliko večja kot v normalni mišici, še posebej pa aktivnost oblik 16S in 13S (slika 2c), tako da je bil vzorec molekularnih oblik precej podoben tistemu v postnatalnem obdobju (slika 2a). Dvig aktivnosti AChE po reinervaciji pa je bil le prehodni, saj se je 14 dni pozneje aktivnost vseh molekularnih oblik, vključno z obliko 16S, približala vrednostim v normalni zreli mišici (slika 2č).

Uraevnanje AChE v hitri mišici ekstenzor digitorum longus med reinervacijo

V nezreli mišici EDL po rojstvu je oblika AChE 16S jasno prisotna v zunajploščičnih predelih, vendar je njena aktivnost precej nižja kot pri SOL, tako da prevladuje globularna oblika 4S (slika 3a). Z zorenjem mišice EDL aktivnost oblike 16S izven motoričnih ploščic praktično izgine, aktivnost globularnih oblik pa se poveča (slika 3b).



Slika 2. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščinih predelih mišice soleus (a – postnatalna mišica živali, starih 16 dni, 6 mišic v vzorcu; b – normalna, zrela mišica odrasle živali, 4 mišice v vzorcu; c – reinervirana mišica, 21. dan po proksimalnem pretišnjenju živca, 4 mišice v vzorcu; č – reinervirana mišica, 35. dan po proksimalnem pretišnjenju živca, 4 mišice v vzorcu). Vrh gradientov je na desni strani. Aktivnost AChE je izražena kot specifična aktivnost na enoto vlažne teže mišice, posamezne oblike pa so označene s svojimi približnimi sedimentacijskimi koeficienti. Puščica predstavlja položaj katalaze (11,3S) v gradientih.

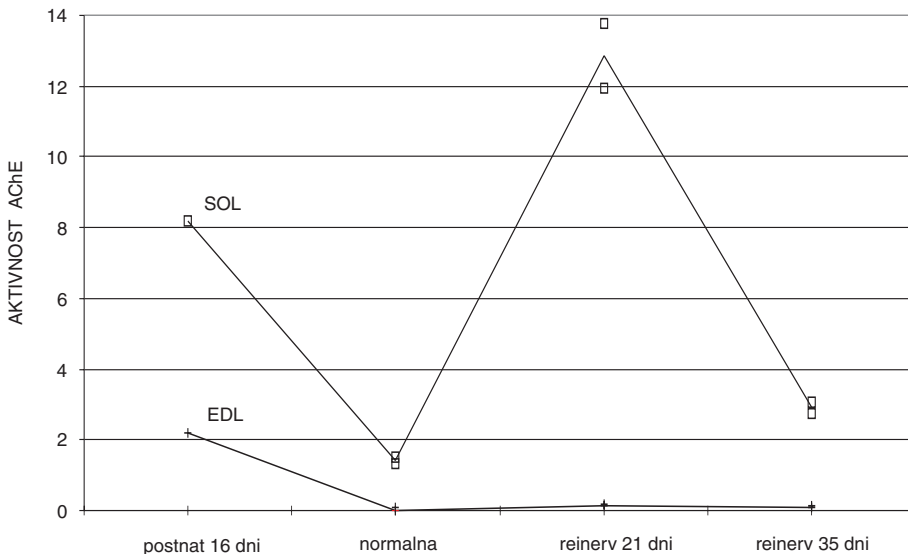


Slika 3. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščičnih predelih mišice ekstenzor digitorum longus (a – postnatalna mišica živali, starih 16 dni, 6 mišic v vzorcu; b – normalna, zrela mišica odrasle živali, 4 mišice v vzorcu; c – reinervirana mišica, 21. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 4 mišice v vzorcu; č– reinervirana mišica, 35. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 4 mišice v vzorcu). Glede drugih oznak glej legendo k sliki 2.

21. dan po pretisnjenju ishiadičnega živca v izvenploščičnih predelih mišice EDL nismo opazili skoraj nobene aktivnosti nesimetrične oblike AChE 16S in v vzorcu je prevladovala globularna oblika AChE 4S (slika 3c). Tudi 14 dni kasneje se vzorec AChE v izvenploščičnih predelih ni bistveno spremenil (slika 3č).

Kvantitativna analiza izvenploščične aktivnosti nesimetrične oblike AChE 16S med zorenjem mišice in med reinervacijo

Aktivnost nesimetrične oblike AChE 16S v izvenploščičnih predelih mišic SOL in EDL smo količinsko ovrednotili z merjenjem površine pod ustreznim vrhom aktivnosti molekularnih oblik AChE (slika 4). V mišici SOL smo ugotovili, da se je po reinervaciji (21. dan po pretisnjenju živca) aktivnost te oblike prehodno povečala okrog 9-krat, s čimer so razmere v mišici postale podobne razmeram v postnatalnem obdobju. Pri mišici EDL pa v izvenploščičnih področjih takega dviga aktivnosti oblike 16S med reinervacijo nismo opazili.



Slika 4. Kvantitativna analiza aktivnosti nesimetrične oblike AChE 16S v izvenploščičnih predelih mišic SOL (kvadrati) in EDL (križi). Postnat 16 dni – postnatalna mišica 16 dni stare živali, v vzorcu je bilo 6 mišic; Normalna – zrela mišica odrasle živali, v vzorcih so bile po 4 mišice; Reiner 21 dni – reinervirana mišica, 21. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, v vzorcih so bile po 4 mišice; Reiner 35 dni – reinervirana mišica, 35. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, v vzorcih so bile po 4 mišice). Aktivnost AChE je izražena kot specifična aktivnost na enoto vlažne teže mišice v arbitrarnih enotah.

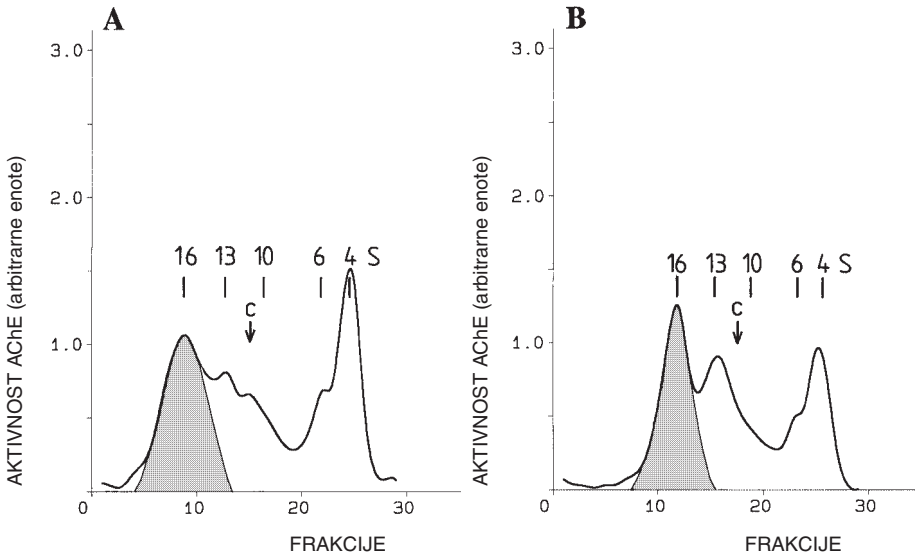
Dejavniki, ki lahko vplivajo na vrnitev mišice soleus v nezrelo postnatalno stanje med reinervacijo

Trajanje prehodne denervacije

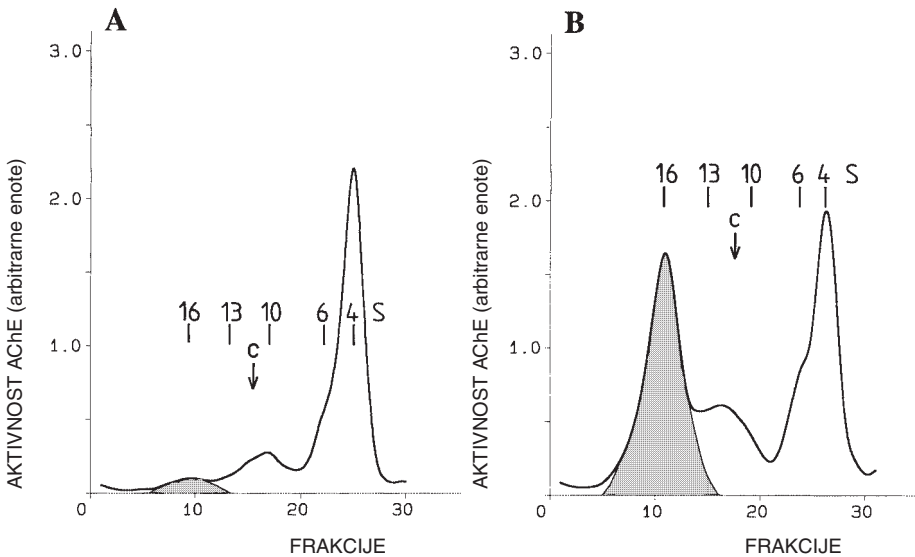
Če pretisnemo živec za mišico SOL tik ob njegovem vstopu v mišico, je zaradi hitre regeneracije živca obdobje denervacije mišice SOL zelo kratko. V takih razmerah smo opazili, da je aktivnost oblike 16S skoraj 4–krat višja kot v normalni mišici in ostane približno enako povečana še tudi 15. dan po pretisnjenju živca (slika 5a in 5b, tabela 1). Če primerjamo aktivnost oblike AChE 16S po kratkotrajni denervaciji s tisto po dolgotrajnejši denervaciji (proksimalno pretisnjen živec, slika 2c in slika 5b), opazimo, da je po kratkotrajni denervaciji približno 2–krat nižja (tabela 1).

Tabela 1. Aktivnost nesimetrične oblike AChE 16S v izvenploščičnih predelih mišice SOL v različnih razmerah. Aktivnost smo določali dvakrat (samo pri nezreli postnatalni mišici in v mišici po distalni aksonotmezi le enkrat). Število mišic, združenih v vzorcu za analizo, je podano v oklepaju (n).

	Aktivnost oblike AChE 16S (arbitrarne enote/enoto teže mišice)		
	Določitev I	Določitev II	(n)
Nezrela postnatalna mišica, 16. dan po rojstvu;	8,21	–	(6)
Normalna zrela mišica	1,53	1,34	(4)
Reinervirana mišica, 8. dan po distalni aksonotmezi;	5,46	5,41	(5)
Reinervirana mišica, 15. dan po distalni aksonotmezi;	4,00	–	(6)
Imobilizirana mišica 8. dan; Reinervirana, 10 dni imobilizirana mišica, 21. dan po proksimalni aksonotmezi;	0,38 6,03	0,23 6,01	(5) (4)
Reinervirana mišica, 21. dan po proksimalni aksonotmezi;	13,78	11,95	(4)
Reinervirana mišica, 25. dan po proksimalni aksonotmezi;	9,51	8,32	(3)
4 dni trajno denervirana mišica, 25. dan po proksimalni aksonotmezi;	2,09	2,40	(3)
Reaktivirana mišica, 15. dan Po paralizi z α-bungarotoksinom;	1,49	2,32	(4)
Reaktivirana mišica, 25. dan Po paralizi z α-bungarotoksinom;	1,41	1,06	(4)



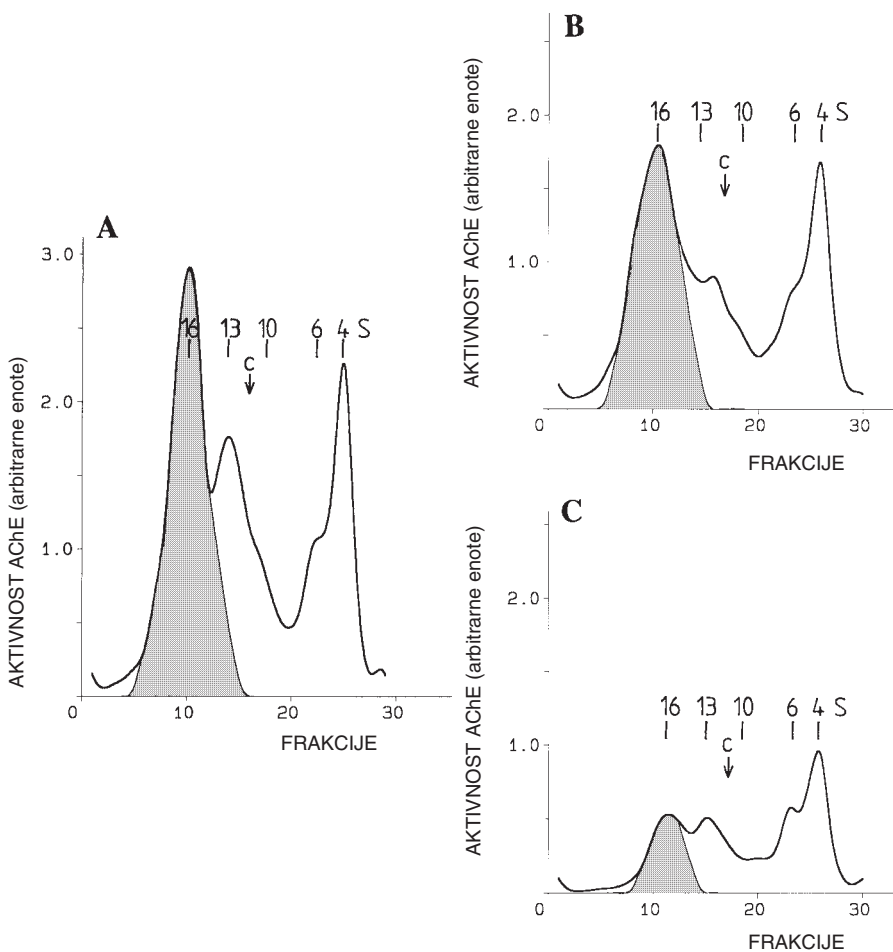
Slika 5. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščičnih predelih mišice SOL (a – reinervirana mišica, 8. dan po distalnem pretisnjenju živca, 5 mišic v vzorcu; b – reinervirana mišica, 15. dan po distalnem pretisnjenju živca, 6 mišic v vzorcu). Glede podrobnosti glej legendo k sliki 2.



Slika 6. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščičnih predelih mišice SOL (a – imobilizirana mišica, 5 mišic v vzorcu; b – reinervirana imobilizirana mišica, 21. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 4 mišice v vzorcu). Glede podrobnosti glej legendo pri sliki 2.

Reinervacija v razmerah mišične nerabe

Reinervacije v razmerah mišične nerabe smo povzročili tako, da smo med obdobjem regeneracije živca zadnjo okončino podgane imobilizirali. V primerjavi z normalno mišico (slika 2b) je pri kontrolni skupini živali imobilizacija v mišici SOL povzročila padec nesimetričnih oblik (16S in 13S), pomembno pa so se zvišale globularne oblike (slika 6a,



Slika 7. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščičnih predelih mišice SOL (a – reinervirana mišica, 21. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 4 mišice v vzorcu; b – reinervirana mišica, 25. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 3 mišice v vzorcu; c – 4 dni trajno denervirana mišica, 25. dan po proksimalnem pretisnjenju živca, 3 mišice v vzorcu). Glede podrobnosti glej legendo k sliki 2.

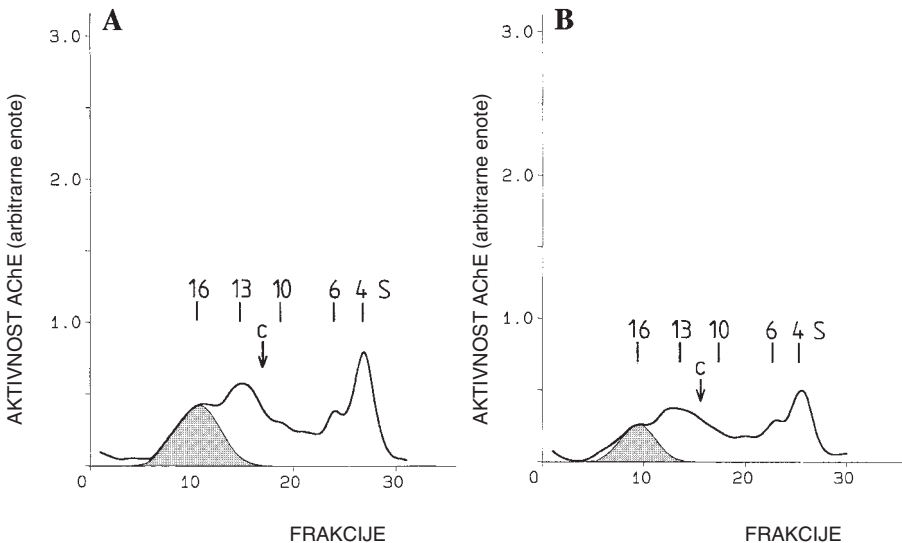
tabela 1). Med reinervacijo mišice SOL pa imobilizacija zadnje okončine ni preprečila povečanja aktivnosti nesimetrične oblike 16S (slika 6b), vendar to povečanje ni bilo tako izrazito kot pri reinervirani mišici SOL v neimobiliziranih okončinah (slika 2c, tabela 1).

Ponovna denervacija mišice SOL med procesom reinervacije

Mišico SOL smo 21. dan po pretisnjenju živca ponovno, tokrat trajno, denervirali. Aktivnost nesimetrične oblike AChE 16S se je četrtega dne po tej denervaciji zmanjšala na približno 20 % vrednosti (slika 7c), opažene 21. dne po pretisnjenju živca (slika 7a). Pri kontrolni skupini mišic, ki niso bile ponovno denervirane, smo istega dne opazili le zmerno znižanje aktivnosti AChE 16S na okrog 70 % vrednosti (slika 7b), izmerjene 21. dne po pretisnjenju živca (tabela 1).

Učinek prehodne paralize namesto denervacije na izvenploščične molekularne oblike AChE v mišici soleus

Z vstavitvijo silikonskega trakca z α -bungarotoksinom smo povzročili prehodno paralizo mišice SOL in drugih mišic goleni za obdobje 3–6 dni, nato pa se je njihova aktivnost zopet vzpostavila. 15. dan po vstavitvi trakca je bil vzorec oblik AChE v izvenploščičnih predelih skoraj normalen, do pomembnega dviga oblike AChE 16S ni prišlo niti 10 dni kasneje (sliki 8a in 8b; tabela 1).



Slika 8. Vzorci aktivnosti molekularnih oblik AChE (analiza s hitrostjo sedimentacije) v izvenploščičnih predelih mišice SOL (A – reaktivirana mišica, 15. dan po paralizi z α -bungarotoksinom, 4 mišice v vzorcu; B – reaktivirana mišica, 25. dan po paralizi z α -bungarotoksinom, 4 mišice v vzorcu). Glede podrobnosti glej legendo k sliki 2.

Razprava

Nesimetrične molekularne oblike AChE so v zrelih mišicah mnogih sesalcev močno skoncentrirane v motoričnih ploščicah (8, 9). Vendar pa nesimetrične oblike v mišicah teh živali niso specifične za motorične ploščice, ampak je njihovo osredotočenje v motoričnih ploščicah razvojni pojav. Pokazali so namreč, da se v obdobju po rojstvu v preponi podgane nesimetrične oblike tvorijo tudi izven motoričnih ploščic vzdolž vsega vlakna, proti koncu prvega meseca po rojstvu pa jih najdemo praktično le v predelih motoričnih ploščic (10). Z dozorevanjem mišice pride torej do zavrtja (supresije) sinteze teh oblik v predelih izven motoričnih ploščic.

Podobno zakonitost smo v pričujoči raziskavi potrdili tudi v mišici SOL in EDL podgane. Aktivnost nesimetrične oblike AChE 16S je v izvenploščičnih predelih nezrele mišice SOL izredno visoka. Med dozorevanjem mišice sicer ta aktivnost znatno pade, toda ne izgine popolnoma. Razvojno pogojeno zavrtje tvorbe izvenploščičnih nesimetričnih oblik AChE v mišici SOL je reverzibilno, kar je nakazala že študija trajne denervacije mišice SOL (19). Povsem nedvoumno pa se je ta reverzibilnost pokazala v naših poskusih po reinervaciji, ki je sledila denervaciji. Med reinervacijo je postal vzorec molekularnih oblik AChE v mišici SOL podoben tistemu v nezreli postnatalni mišici (»vrnitev v nezrelo postnatalno stanje«). V zvezi z uravnavanjem AChR povzroči tako vrnitev že sama denervacija mišice (36), glede AChE pa se vrnitev mišice SOL v nezrelo stanje vzpostavi šele ob njeni reinervaciji.

Raziskave, ki so potekale v podobnih razmerah kot naši poskusi, so pokazale, da se po pretisnjenju ishiadičnega živca na stegnu začne reinervacija golenskih mišic približno čez 2 tedna, refleks razpiranja prstov zadnje tačke pa se popolnoma obnovi po 3 tednih (38, 42). Prehodna denervacija v našem poskusu je torej trajala 2–3 tedne. Zanimalo nas je, ali je trajanje denervacije odločilno za vrnitev mišice v nezrelo postnatalno stanje. Poskus z distalnim pretisnjenjem živca tik ob vstopu v mišico SOL, pri katerem je pot za regenerirajoče se aksone zelo kratka, tako da nastopi reinervacija mišice SOL v 3–4 dneh, je pokazal, da pride do vrnitve v nezrelo postnatalno stanje že po nekajdnevni denervaciji. Ker pa porast nesimetričnih oblik v tem primeru ni bil tako visok kot po dolgotrajnejši denervaciji, se zdi, da je za popolno vrnitev v nezrelo stanje kljub vsemu potrebno daljše obdobje prehodne denervacije.

Zanimal nas je tudi pomen stalne prisotnosti živca med reinervacijo za povrnitev sposobnosti izvenploščične sinteze nesimetrične oblike 16S v mišici SOL. Ugotovili smo, da prekinitev živca med procesom reinervacije sproži hiter padec aktivnosti nesimetrične oblike AChE 16S v izvenploščičnih predelih mišice SOL, kar pomeni, da je za ohranitev nezrelega stanja te mišice med reinervacijo potrebno stalno oživčenje. Izsledki so ovrgli domnevo, da bi lahko reinervacija v mišici SOL sprožila nezrelo stanje, ki bi se nato vzdrževalo samo od sebe.

V nasprotju z mišico SOL pa med reinervacijo mišice EDL ni prišlo do ponovnega porasta aktivnosti nesimetrične oblike 16S v področju izven ploščic. Mišica EDL se torej niti med reinervacijo v tem pogledu ne povrne v nezrelo postnatalno stanje. Zdi se, da

je v mišici EDL razvojno pogojeno zavrtje tvorbe nesimetričnih oblik AChE izven motoričnih ploščic ireverzibilno.

Možni sta dve razlagi različnega uravnavanja AChE v mišicah SOL in EDL med reinervacijo:

- vzorca živčnega draženja se normalno v obeh mišicah pomembno razlikujeta (15). Mišica SOL dobi na dan bistveno več živčnih impulzov kot EDL, pri slednji pa je frekvenca impulzov večja, čeprav se motorične enote redko vzdražijo. Možno bi bilo, da se ta razlika nevrogenih vzorcev draženja vsaj delno ohrani med procesom reinervacije, kar bi lahko pripeljalo do omenjene razlike v uravnavanju AChE med reinervacijo. Rezultati reinervacije mišice SOL v razmerah mišične nerabe pa govorijo proti tej domnevi. Med imobilizacijo okončine se namreč vzorec živčnega draženja mišice SOL značilno spremeni: postane fazičen in število impulzov se zmanjša na 15 % kontrolne vrednosti (43). Skladno s tem smo tudi mi ugotovili, da imobilizacija spremeni vzorec izvenploščičnih molekularnih oblik AChE v mišici SOL tako, da postane precej podoben tistemu v EDL: aktivnost nesimetričnih oblik pade, globularnih pa naraste. Kljub temu pa tudi v imobilizirani okončini med reinervacijo še vedno opazimo vrnitev mišice SOL v nezrelo postnatalno stanje. Domnevamo torej lahko, da vzorec živčnega draženja ni odločilen za vrnitev mišice SOL v postnatalno nezrelo stanje;
- zato se nam zdi verjetnejša hipoteza, da so razlike med obema mišicama pogojene genetsko (intrinzične razlike). V prid tej domnevi govori ugotovitev, da se razlike v vzorcih molekularnih oblik AChE v obeh mišicah pojavijo zelo zgodaj med postnatalnim razvojem (17, 24), še preden se vzpostavijo razlike v vzorcih živčnega draženja (25). Tudi poskusi z navzkrižno presaditvijo in regeneracijo podpirajo domnevo o intrinzičnih razlikah uravnavanja AChE (18). Domnevamo lahko, da je zaradi intrinzičnih razlik med obema mišicama tvorba nesimetričnih AChE med razvojem v mišici EDL zavrtja ireverzibilno, v mišici SOL pa reverzibilno, zato se prva v tem pogledu ne more vrniti v nezrelo stanje, druga pa lahko.

Paraliza mišice z botulinovim toksinom vpliva na uravnavanje zunajploščičnih oblik AChE v mišicah SOL in EDL enako kot denervacija (44), iz česar so avtorji sklepali, da je elektromehanična aktivnost mišice, ki jo proži živec, tista, ki odločilno vpliva na uravnavanje AChE izven motoričnih ploščic. Zato se nam je zdelo zanimivo proučiti, ali bi lahko tudi prehodna paraliza namesto prehodne denervacije povzročila vrnitev mišice SOL v nezrelo stanje glede uravnavanja AChE. Rezultati poskusov s paralizo z α -bungarotoksinom so pokazali, da prehodna paraliza zaradi blokade AChR ne zadošča – torej ne povzroči vrnitve mišice SOL v nezrelo stanje v obdobju ponovne reaktivacije mišice po paralizi.

Možnih je več razlag, zakaj je paraliza manj učinkovita od denervacije:

- razlika med paralizo mišice z α -bungarotoksinom in denervacijo mišice je npr. v tem, da se pri paralizi ohrani živčno-mišični stiki in da tudi med paralizo domnevni trofični dejavniki iz živca lahko prehajajo v mišico, kar je po denervaciji nemogoče, ker živčni končič propade. Ti dejavniki bi morebiti lahko preprečili vrnitev mišice SOL v nezrelo postnatalno stanje. Slabost te razlage je v tem, da bi morali pri uravnavanju AChE na področjih izven motoričnih ploščic ti dejavniki difundirati in delovati zelo daleč od motoričnih ploščic vzdolž celotnega mišičnega vlakna, da bi lahko povsod vzdrževali zavrtje tvorbe nesimetričnih oblik AChE, kar ni zelo verjetno;

- verjetnejša se nam zdi zato naslednja razlaga: α -bungarotoksin prekine samo živčno-mišični prenos in ne prizadene drugih delov miotatičnega refleksa, medtem ko denervacija prekine tudi aferentni del refleksnega loka. Zato domnevamo, da se v mišici SOL takoj po prekinitvi paralize vzpostavi bolj ali manj normalen tonični vzorec živčnega draženja, po reinervaciji, ki sledi denervaciji, pa najbrž ne, ker se mora prej obnoviti celotni refleksni lok. Mogoče bi torej bilo, da tonični vzorec živčnega draženja v mišici SOL, ki se vzpostavi takoj po reaktivaciji, morda prepreči vrnitev mišice SOL v nezrelo postnatalno stanje. Skladno s to domnevo je tudi opažanje, da se izvenploščična tvorba nesimetričnih oblik AChE med normalnim zorenjem mišice SOL zmanjša šele po tem, ko se v tej mišici vzpostavi tonični vzorec živčnega draženja (17, 25).

Sklepi

S stališča uravnavanja nesimetrične oblike AChE 16S (A12) povzroči reinervacija po prehodni denervaciji mišice začasno vrnitev počasne mišice SOL v nezrelo postnatalno stanje: tvorba te oblike AChE se v izvenploščičnih predelih mišice močno prehodno poveča. Hitra mišica EDL pa se med reinervacijo ne povrne v nezrelo stanje; zdi se, da je sinteza izvenploščičnih nesimetričnih oblik AChE v tej mišici ireverzibilno zavrta.

Za vrnitev mišice SOL v omenjeno nezrelo stanje zadostuje že kratka, nekajdnevna prehodna denervacija, za popolno uveljavitev nezrelega stanja pa je potreben daljši čas denervacije pred reinervacijo.

Za vzdrževanje nezrelega stanja v kratkem obdobju po reinervaciji mišice SOL je nujna stalna prisotnost oživčenja te mišice.

Spremenjena raba mišice SOL ob imobilizaciji zadnje okončine, ki povzroči spremembo vzorca proženja motoričnega živca, ne prepreči vrnitve mišice SOL v nezrelo postnatalno stanje med reinervacijo, zato vzorec draženja mišice med reinervacijo najbrž ni odločilen za ta pojav.

Za vrnitev mišice SOL v nezrelo stanje ne zadošča začasna paraliza zaradi blokade AChR, ki ji sledi reaktivacija mišice, ampak sta potrebni prehodna denervacija in reinervacija.

Zahvala

Prof. dr. Janezu Sketlju, svojemu mentorju, se zahvaljujem za strokovno in spodbudno vodenje raziskovalnega dela.

Zahvaljujem se tudi dr. Nevi Črne-Finderle za njeno pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu.

Nini Javornik, Heleni Kupšek in Borisu Pečenku se zahvaljujem za vsestransko tehnično pomoč.

Literatura

1. Engel AG. The neuromuscular junction. In: Engel AG, Banker BQ, eds. *Myology*. New York: McGraw, 1986: 209–53.
2. Katz B, Miledi R. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from synaptic cleft. *J Physiol (Lond)* 1973; 231: 549–74.
3. Brzin M, Kiauta T. Cholinesterase of the motor end-plate of the rat diaphragm. *Progr Brain Res* 1979; 49: 313–22.
4. Brzin M, Pucihar S. Iodide, thiocyanate and cyanide ions as capturing reagents in one-step copper-thiocholine method for cytochemical localization of cholinesterase activity. *Histochem J* 1976; 48: 238–92.
5. Brzin M, Sketelj J, Klinar B. Cholinesterases. In: Lajtha A., ed. *Handbook of neurochemistry*. New York: Plenum Press, 1983, 4: 251–92.
6. Massoulié J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 1982; 5: 57–106.
7. Toutant J-P, Massoulié J. Acetylcholinesterase. In: Kenny AJ, Turner AJ, eds. *Mammalian ectoenzymes*. Amsterdam: Elsevier, North Holland Publishers, 1987: 289–328.
8. Hall ZW. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J Neurobiol* 1973; 4: 343–61.
9. Sketelj J, Brzin M. Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscle. *J Neurosci Res* 1985; 14: 95–103.
10. Sketelj J, Brzin M. 16 S acetylcholinesterase in endplate-free regions of developing rat diaphragm. *Neurochem Res* 1980; 5: 653–8.
11. Carson S, Bon S, Vigny M, Massoulié J, Fardeau M. Distribution of acetylcholinesterase molecular forms in neural and non-neural sections of human muscle. *FEBS Lett* 1979, 97: 348–52.
12. Gauthier GF. Skeletal muscle fiber types. In: Engel AG, Banker BQ, eds. *Myology*. New York: McGraw, 1986: 255–83.
13. Pette D, Vrbova G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* 1985; 8: 676–89.
14. Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 51–5.
15. Hennig R, Lomo T. Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature* 1985; 314: 164–6.
16. Groswald DE, Dettbarn W-D. Characterization of acetylcholinesterase molecular forms in slow and fast muscle of rat. *Neurochem Res* 1983; 8: 983–95.
17. Sketelj J, Črne N, Ribarič S, Brzin M. Interactions between intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in fast and slow skeletal muscle. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 35–54.
18. Dolenc I, Črne-Finderle N, Eržen I, Sketelj J. Sattelite cells in slow and fast rat muscles differ in respect to acetylcholinesterase regulation mechanisms they convey to their myo-fibers during regeneration. *J Neurosci Res* 1994; 37: 236–46.
19. Sketelj J, Črne-Finderle N, Brzin M. Influence of denervation on the molecular forms of junctional extrajunctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 1992; 21: 415–21.
20. Tennyson VM, Brzin M, Slotwiner P. The appearance of acetylcholinesterase in the myotome of the embryonic rabbit. *J Cell Biol* 1971; 51: 703–21.
21. Giacobini G, Filogamo G, Weber M, Boquet P, Changeux JP. Effects of snake α -neurotoxin on the development of innervated skeletal muscles in chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 1708–12.
22. Bennet MR, Pettigrew AG. The formation of synapses in striated muscle during development. *J Physiol* 1974; 241: 515–45.
23. Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev Biol* 1981, 81: 266–79.
24. Dettbarn W-D, Groswald D, Gupta RC, Misulis KE. Use and disuse and control of acetylcholinesterase activity in fast and slow twitch muscle of rat. In: Changeux JP, Hucho F, Maelicke A in Neumann E, eds. *Molecular basis of nerve activity*. New York: Walter de Gruyter, Inc., 1985: 567–87.
25. Navarette R, Vrbova G. Changes of activity patterns in slow and fast muscles during postnatal development. *Dev Brain Res* 1983; 8: 11–9.

26. Fambrough DM, Rush JE. Development of acetylcholine sensitivity during myogenesis. *Dev Biol* 1971; 26: 55–68.
27. Bevan S, Steinbach JH. The distribution of α -bugarotoxin binding sites on mammalian skeletal muscle developing in vivo. *J Physiol Lond* 1977; 267: 195–213.
28. Fallon JR, Gelfman CE. Agrin-related molecules are concentrated at acetylcholine receptor clusters in normal and aneural developing muscle. *J Cell Biol* 1989; 108: 1527–35.
29. Magill-Solc C, McMahan UJ. Motor neurons contain agrin-like molecules. *J Cell Biol* 1988; 107: 1825–33.
30. Pathy L, Nikolics K. Functions of agrin and agrin-related proteins. *Trends Neurosci* 1993; 16: 76–81.
31. Nastuk M-A, Fallon J-R. Agrin and the molecular choreo-graphy of synapse formation. *Trends Neurosci* 1993; 16: 72–6.
32. Sketelj J, Brzin M. Intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in skeletal muscles. In: Massoulie J, Bacou F, Barnard E, Chatonnet A, Doctor BP, Quinn DM, eds. *Cholinesterases*. Washington: ACS Books, 1991: 66–70.
33. Bloch RJ, Pumphlin DW. Molecular events in synaptogenesis: nerve-muscle adhesion and postsynaptic differentiation. *J Physiol* 1988; 254: 345–64.
34. Peng HB, Cheng PC. Formation of postsynaptic specializations induced by latex beads in cultured muscle cells. *J Neurosci* 1982; 2: 1760–74.
35. Lomo T, Rosenthal J. Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol* 1972; 221: 493–513.
36. Hartzell HC, Fambrough DM. Acetylcholine receptors. Distribution and extrajunctional density in rat diaphragm after denervation correlated with acetylcholine sensitivity. *J Gen Physiol* 1972; 60: 248–62.
37. Collins PL, Younkin SG. Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J Biol Chem* 1982, 257: 13638–44.
38. Groswald DE, Dettbarn W-D. Nerve crush induced changes and molecular forms of acetylcholinesterase in soleus and extensor digitorum muscles. *Exp Neurol* 1983; 79: 519–31.
39. Koenig J, Rieger F. Biochemical stability of the AChE molecular forms after cytochemical staining: post-natal focalization of the 16 S AChE in rat muscle. *Dev Neurosci* 1981; 4: 249–57.
40. Martin RG, Ames. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J Biol Chem* 1961; 236: 1372–9.
41. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.
42. Ribarič S. *Vpliv in mehanizmi delovanja šibkih enosmernih električnih tokov na regeneracijo periferne živca in skeletne mišice*. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1992.
43. Fischbach GD, Robbins N. Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J Physiol* 1969; 201: 305–20.
44. Sketelj J, Črne-Finderle N, Sket D, Dettbarn W-D, Brzin M. Comparison between the effects of botulinum toxin-induced paralysis and denervation on molecular forms of acetylcholinesterase in muscles. *J Neurochem* 1993; 61: 501–8.

Prispelo 14.11.1994

