

Andrej Bartolič<sup>1</sup>, Matjaž Sever<sup>2</sup>

# Acetilholinesteraza v električno draženi denervirani mišici *extensor digitorum longus* podgane<sup>3</sup>

*Acetylcholinesterase in Electrically Stimulated Denervated Muscle Extensor Digitorum Longus of the Rat*

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** mišična denervacija, električna stimulacija, acetilholinesteraza, podgane

**Izhodišče.** Temelj delovanja živčevja je sporočanje preko sinaps, zato so mehanizmi uravnavanja sinteze sinaptičnih struktur in njihovega usmerjanja na mesto delovanja predmet mnogih raziskav. V teh se zaradi dostopnosti kot eksperimentalni model uporablja živčno-mišični stik, ki ga sestavlja med drugimi strukturami tudi encim acetilholinesteraza (AChE). Vloga AChE je ključna za živčno-mišični prenos, ki ga prekinja s tem, da v sinaptični špranji razgrajuje živčni prenašalec acetilholin. Pri tem pa igrata pomembno vlogo njena aktivnost in razporeditev, ki sta odvisni od ekspresije gena. Slednja je odvisna od različnih dejavnikov in njihovega medsebojnega vpliva, in to predvsem od elektromehanične aktivnosti in lokalno delujočih živčnih trofičnih dejavnikov. Denervacija mišice vodi zaradi odtegnitve omenjenih dejavnikov do značilnih atrofičnih sprememb mišice, zmanjšanja aktivnosti AChE v živčno-mišičnem stiku, kot tudi upada ravni AChE mRNA v celici.

**Namen in hipoteza.** V poskusih smo preučevali vpliv električnega draženja na raven AChE mRNA in aktivnost AChE v denervirani hitri mišici *extensor digitorum longus* (EDL). Na živalskem modelu smo to mišico dražili z različnimi vzorci draženja, ki so značilni za hitre mišice. Primerjali smo ravni AChE mRNA in aktivnosti AChE v mišici pri različnih vzorcih draženja, da bi preverili naslednjo hipotezo:

Izbrani enostavni vzorec električnega draženja mišice EDL lahko delno prepreči spremembe ravni AChE mRNA in aktivnosti AChE, ki nastanejo po denervaciji.

**Razlaga hipoteze.** Elektromehanična aktivnost, povzročena z živcem, je v mišici ključna za uravnavanje presnove AChE. Zaradi odsotnosti te aktivnosti pride pri podgani po denervaciji v prvem tednu do padca ravni AChE mRNA in s tem zmanjšanja aktivnosti AChE. Električno draženje vpliva na mnoge poddenervacijske spremembe mišice in jih do določene mere tudi prepreči. V literaturi je opisanih veliko različnih načinov draženja, nikjer pa še ni ugotovljen najprimernejši vzorec neposrednega draženja, ki bi preprečil spremembe aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v mišici EDL. Z uporabo različnih vzorcev draženja mišice lahko pričakujemo, da bomo odkrili najprimernejšega, pri katerem bi prišlo do čim manjših sprememb glede na normalno oživčeno mišico.

**Metode.** Poskuse smo izvedli na podganjih samcih soja Wistar. Poskusne živali smo razdelili v štiri skupine. V prvi skupini smo mišico EDL denervirali, nato pa električno dražili

<sup>1</sup> Andrej Bartolič, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana.

<sup>2</sup> Matjaž Sever, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana.

<sup>3</sup> Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 2000.

z različnimi vzorci, v drugi skupini smo mišico dražili posredno preko živca, v tretji skupini smo izvedli samo denervacijo in namestitev elektrod brez električnega draženja, v četrti skupini pa smo le namestili elektrode brez denervacije in električnega draženja. Po štirih dneh smo mišice izolirali. Aktivnost AChE smo izmerili s spektrofotometrom, raven AChE mRNA pa z metodo Northern-blot. Rezultate smo statistično obdelali s Kruskal-Wallisovim testom in neparnim Wilcoxonovim testom.

**Rezultati.** Prav v vseh skupinah podgan je prišlo v denervirani mišici EDL do pomembnega zmanjšanja aktivnosti AChE v primerjavi z normalno oživčeno mišico druge zadnje okončine. Različni vzorci električnega draženja so bili različno uspešni pri preprečevanju zmanjšanja aktivnosti AChE v denervirani mišici. Najvišjo vrednost aktivnosti AChE, ki se je statistično značilno razlikovala od aktivnosti pri drugih skupinah denerviranih mišic ( $p < 0,01$ ), smo dosegli z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min. Isti vzorec draženja je bil najbolj uspešen tudi pri preprečevanju upada ravni AChE mRNA.

**Zaključki.** Omenjeni rezultati so potrdili našo hipotezo. Namreč, med izbranimi enostavnimi vzorci električnega draženja obstaja vzorec, ki lahko delno prepreči upad ravni AChE mRNA in zmanjšanje aktivnosti AChE po denervaciji. Glede na delno uspešnost uporabljenega enostavnega vzorca nas rezultati navajajo k sklepu, da pri vzdrževanju normalne ravni AChE mRNA in aktivnosti AChE sodelujejo še drugi mehanizmi. Ti so zelo verjetno kompleksnejši vzorci aktivacije mišice, ločena aktivacija posameznih motoričnih enot v mišici z različnimi vzorci aktivacije in živčni trofični dejavniki, ki se sproščajo iz perifernega živca.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** muscle denervation, electric stimulation, acetylcholinesterase, rats

**Background.** The basis for the function of the nervous system is signalling among the nerve cells through the synapses. Normal signalling requires precise synthesis and localisation of synaptic structures within the cell. There is a lot of work done in this field and the most often used model for the research is the neuromuscular junction because of its accessibility. The enzyme acetylcholinesterase (AChE) plays a crucial role in it by degrading acetylcholine and by that stopping the electrical signal among the nerve cells. The activity and localisation within the cell are very important for the proper function of the AChE. They depend on the expression of the AChE gene, which is further dependant on many factors and their interrelationships. Among them, the most important are electromechanical activity and local neural mediators. Denervation of the muscle causes a lack of the factors mentioned above and consequently leads to atrophic changes of the muscle, decrease of the AChE activity in neuromuscular junction and the level of AChE mRNA in the muscle cells.

**Aim and hypothesis.** Our observations were based on the measurement of the AChE activity and the level of AChE mRNA in the fast rat *extensor digitorum longus* (EDL) muscle. We used different stimulation patterns on the animal model. The results were then compared in order to test the next hypothesis:

Change in the level of AChE mRNA and the activity of AChE in the EDL muscle after denervation can be partially prevented by a specific simple pattern of electrical muscle stimulation.

**Rationale for hypothesis.** Electromechanical activity caused by the nerve is crucial for the regulation of AChE metabolism. Denervation of the muscle causes a drop of AChE activity and level of AChE mRNA within the first week. Electrical stimulation can affect many post-denervational processes and can stop them to a certain extent. However, a stimulation pattern that would prevent the postdenervational changes of AChE activity and level of AChE mRNA in the EDL muscle has not been discovered yet. By using different patterns of stimulation

we can expect to find the most appropriate one, that would cause the least change comparing to the normal innervated muscle.

**Methods.** The experiments were performed on female Wistar rat strains. Animals were divided in four groups. In the first group of animals the EDL muscles were denervated and then stimulated with different electrical patterns. In the second group muscles were stimulated through the nerve. In the third group muscles were denervated and the electrodes were placed as usually, but there was no stimulation. And in the fourth group we only placed the electrodes on usual places without denervation and stimulation of the muscles. After four days of stimulation the isolation of the EDL muscles was performed. We measured the AChE activity in the muscles with a spectrophotometrical method and the level of AChE mRNA with the Northern-blot method. The results were statistically evaluated with Kruskal-Wallis test and unpaired Wilcoxon's test.

**Results.** In all groups of denervated EDL muscles we measured a significant drop of the AChE activity comparing to the normally innervated muscle of the other leg. Different patterns of electrical stimulation had various success in preventing the postdenervational drop of AChE activity. However, the highest AChE activity was obtained with the stimulation pattern with frequency of impulses 150 Hz, duration of impulse trains 0.2 s and interval between trains of 15 min. This AChE activity was significantly different from the activities of other groups of denervated muscles ( $p < 0,01$ ). Similar results were obtained with the measurement of the level of AChE mRNA. The same pattern proved to be the most successful in preventing AChE mRNA level drop.

**Conclusions.** The above mentioned results proved our hypothesis. There does exist a simple stimulation pattern that can partially prevent the postdenervational decrease of AChE mRNA level and AChE activity. However, due to inability to completely prevent that decrease, we can conclude that there must be other mechanisms involved in maintenance of normal level of AChE mRNA and activity of AChE. These are most probably more complex muscle activation patterns, separate activation of motor units within the muscle with different activation patterns and local mediators from the peripheral nerve.

## UVOD

### Acetilholinesteraza

Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki igra pomembno vlogo predvsem kot sestavni del holinergičnih sinaps, kjer hidrolizira acetilholin (ACh) in s tem prekine posinaptični učinek ACh. AChE in sorodni encim butirilholinesteraza spadata med holinesteraze, skupino serinskih esteraz (1-10).

### Struktura acetilholinesteraze

Glede na strukturo so molekule AChE zelo polimorfne (2, 11, 12), vse molekularne oblike pa so glikoproteini, pri katerih 10-20% mase predstavljajo kovalentno vezani oligosaharidi (1). Molekularne oblike AChE najbolj ločimo po hitrosti sedimentacije v linearnih saharoznih gradientih (8, 13, 14). Podrobne raziskave so pokazale, da obstajata dva raz-

reda molekul AChE: globularne (G), po večini homomerne oblike, in asimetrične oblike (A), ki so vse heteromerne (8, 15, 16). V vseh nastopa kot temeljna enota katalitična podenota, ki je globularna (1). To je elipsoidna beljakovina, ki meri približno  $4,5 \times 6,0 \times 6,5$  nm. V aktivnem centru encima se nahaja esterazno mesto, kjer leži serin aktivnega centra. Aktivni center leži na dnu globeli v katalitični podenoti in tu najdemo katalitično triado iz serinskega, histidinskega in glutamatnega aminokislinskega ostanka. Na površini katalitične podenote poleg vhoda v globel leži alosterično mesto, ki je odgovorno za substratno inhibicijo in vezavo nekaterih ligandov (1, 17, 18).

Globularne oblike AChE so tetrameri ( $G_4$ ), dimeri ( $G_2$ ) in monomeri ( $G_1$ ), ki so sestavljeni iz štirih, dveh ali ene katalitične podenote. Te podenote v globularnih oblikah delimo v dva razreda. Amfifilna (hidrofobna

ali H) oblika katalitične podenote nastopa v dimerih, na cisteinski ostanek na karboksilnem koncu pa ima vezan glikolipid, ki ji omogoča pritrnitev na lipidni del membran. To obliko AChE imenujemo na glikozilfosfatidilinozitol vezani dimer (GPI-linked dimer). Katalitična podenota T (tail), ki nastopa v vseh ostalih oblikah AChE, ima drugačen karboksilni konec, ki ji omogoča nahajanje na treh različnih mestih: pritrnitev na kolagenski rep, pritrnitev na hidrofobni peptid, ki veže tetramere na površino celične membrane, ali neposredno vezavo na fosfolipide (1, 6, 8, 12).

Asimetrične oblike AChE pa so zgrajene iz enega, dveh ali treh tetramerov katalitičnih podenot T (G4), kovalentno povezanih s tremi polipeptidnimi verigami iz kolagena Q, ki so zavite v trojno vijačnico in tvorijo nekakšen rep, ki je potreben za pritrnitev molekule AChE na zunajcelični matriks. Te asimetrične oblike označimo  $A_4$ ,  $A_8$  in  $A_{12}$  glede na skupno število katalitičnih podenot, ki jih vsebujejo. Nekatere asimetrične oblike pa lahko poleg repa vsebujejo še druge nekatalitične podenote, katerih vloga še ni znana (19, 20). Oblika  $A_{12}$  je v tkivih najpogostejša, ostali dve pa sta prisotni v majhnih količinah in še ni znano ali sta funkcionalni ali le razgradna produkta (1, 6, 8, 12).

### Nahajanje acetilholinesteraze

Opisani polimorfizem molekul AChE omogoča, da se različne oblike encima nahajajo v različnih tipih celic in na različnih mestih v celici (1, 12, 21). Za sesalce tako velja, da se asimetrične oblike AChE nahajajo le v mišicah in živčnih celicah, amfifilne oblike pa v celicah hemopoetskega izvora (1, 8).

Naša raziskava obravnava AChE v mišičnem tkivu. V gladki mišici in srcu ni asimetričnih oblik AChE, ampak predvsem dimerne in tetramerne globularne oblike (1). Porazdelitev in molekularne oblike AChE v skeletni mišici pa so natančneje raziskane in se razlikujejo glede na tip mišice. Mišična vlakna pri sesalcih namreč glede na fiziološke in biokemične lastnosti v grobem delimo na hitra, bolj glikolitična vlakna (tip II z več podtipi) in počasna, bolj oksidativna vlakna (tip I) (22–25). V večini mišic sta zastopani obe vrsti vlaken, v nekaterih mišicah pa je skoraj samo

ena vrsta. Tako pri podgani mišica *extensor digitorum longus* (EDL) vsebuje predvsem hitra vlakna, mišica *soleus* (SOL) pa počasna (24, 26). Hitre in počasne mišice se razlikujejo v skupni aktivnosti AChE, v oblikah encima in porazdelitvi teh oblik v in izven živčno-mišičnega stika (ŽMS). Skupna aktivnost AChE, kot tudi aktivnost posameznih globularnih oblik encima, je v hitrih mišicah absolutno večja kot v počasnih mišicah (27–30). Od posameznih oblik pa v mišici EDL prevladuje oblika G1 AChE, sledi ji oblika A12, ki pa je prisotna le v področju ŽMS, tretjo najvišjo aktivnost pa ima oblika G4. Drugačna so razmerja v mišici SOL, kjer ima najvišjo aktivnost v ŽMS oblika A12 AChE, izven ŽMS je je manj, a je za razliko od EDL prisotna, sledita pa obliki G1 in A8 (2, 27, 30).

Porazdelitev AChE v skeletni mišici je neenakomerna tudi na subceličnem nivoju, kar lahko ugotovljamo z uporabo inhibitorjev encima, ki prehajajo ali pa ne skozi plazmalemo (1, 31). Vsaj polovica AChE se nahaja intracelularno, kjer najdemo encim predvsem v zrnatem endoplazmatskem retikulumu, Golgijevem aparatu, vezikulah, na jedrni membrani, zanemarljivo malo pa ga je v citosolu (1, 32, 33). Znotraj celice so predvsem globularne oblike encima in malo asimetričnih, to so večinoma novo sintetizirane molekule na poti k plazmalemi (1). Ekstracelularno najdemo vse oblike AChE razen monomerne globularne oblike. Ostale globularne oblike so v določeni meri vezane na zunanjo stran plazemske membrane, asimetrične oblike pa so vezane na bazalno membrano okoli mišičnih vlaken (1, 34).

Značilno porazdelitev AChE lahko ugotovljamo tudi znotraj oziroma izven ŽMS (1). Čeprav ima encim v ŽMS veliko aktivnost, pa ta del predstavlja le manjši delež skupne količine AChE (2). V ŽMS se AChE nahaja na posinaptični sarkolemi, v bazalni lamini v primarnih in sekundarnih sinaptičnih špranjah, presinaptično na aksolemi živčnega končiča in v prostorih med nevroni in Schwannovimi celicami (2, 35–39). Pri podgani so globularne oblike AChE prisotne vzdolž celega mišičnega vlakna, medtem ko je, vsaj pri hitrih mišicah, asimetrična oblika  $A_{12}$  omejena na področje sinapse, kjer je s pomočjo repa vezana na sinaptično bazalno lamino (1, 2, 7,

40, 41). Asimetrična oblika A<sub>12</sub>AChE je prevladujoča oblika encima v ŽMS (27, 40, 42–46). V počasnih mišicah, kot je SOL, pa so asimetrične oblike AChE prisotne vzdolž vsega mišičnega vlakna (30).

### Funkcija acetilholinesteraze

Glavna funkcija AChE je hitra hidroliza sproščenega ACh v holinergičnih sinapsah v centralnem in perifernem živčevju (1, 47, 48). Vendar pa prisotnost encima tudi v neholinergičnih celicah (npr.: eritroidne in limfoidne celice) in v nezrelem živčevju brez holinergične aktivnosti nakazuje nekatere druge možne funkcije (1). Med bolj verjetnimi možnimi vlogami AChE so tudi vloga adhezijske oziroma prepoznavne molekule (1, 41) in nevroregulatorna vloga v določenih predelih centralnega živčnega sistema (1, 49). V tem uvodu se bomo omejili le na klasično funkcijo AChE, to je hidrolizo ACh.

AChE spada med serinske esteraze, ki imajo serin na katalitičnem mestu, pri čemer serinska hidroksilna skupina sodeluje pri nastanku kompleksa encim-substrat. Novejše študije pa glede na strukturo in zaporedje aminokislinskih vrščajo AChE v ločeno skupino s še nekaterimi serinskimi hidrolazami (1, 2, 41).

Glavni substrat AChE je ACh, hidrolizira pa lahko tudi druge estre, a počasneje, prav tako pa lahko druge esteraze hidrolizirajo ACh (1). Sama reakcija poteka tako, da se ACh veže na nabito področje na površini katalitične podenote, v bližini globeli, na dnu katere leži aktivni center. Nato ACh drsi vzdolž globeli do končne razširitve, kjer se nahajajo tri katalitične aminokisliline (serin, histidin, glutaminska kislina). Kisikov atom proste hidroksilne skupine serina reagira z ogljikovim atomom  $\alpha$  acetatnega dela substrata, nastane acetiliran encimski intermediat, sprosti se molekula holina. Acetiliran encim reagira z vodo, odcepi se očetna kislina in ostane regeneriran encim. Reakcija hidrolize ACh z AChE poteka zelo hitro in je ena najhitrejših encimskih reakcij (1, 50). Pri oblikah AChE z več katalitskimi podenotami se vsaka od njih obnaša neodvisno, vsaka ima eno aktivno mesto in med njimi ni alosteričnih interakcij (1).

### Presnova acetilholinesteraze v skeletni mišici

Aktivnost AChE v zreli skeletni mišici je odvisna od procesov sinteze in razgradnje tega encima ter s tem od regulatornih dejavnikov, ki vplivajo na ta dva procesa.

### Sinteza acetilholinesteraze

#### Potek sinteze acetilholinesteraze

AChE kodira samo en gen, ki leži na kromosomu 7p22 (51). Gen je podoben pri različnih živalskih vrstah, kar nakazuje precejšnjo evolucijsko ohranjenost (52–54). Z različnim pripajanjem (*splicing*) primarnega transkripta pa lahko nastanejo tri različne mRNA (55, 56) in iz njih tri vrste katalitičnih podenot. Del katalitične podenote, ki je skupen vsem molekularnim oblikam AChE, kodirajo eksoni 2 in 3 ter del eksona 4. Z različnim spajanjem pa se C-konec lahko končuje na tri načine:

- s pripajanjem preostanka eksona 4 nastane katalitična podenota R (readthrough);
- z alternativnim pripajanjem eksona 5 nastane katalitična podenota H (hydrophobic);
- in z alternativnim pripajanjem eksona 6 nastane katalitična podenota T (tail).

Katalitična podenota H se nahaja v na glikozilfosfatidilinozitol vezanih dimerih (GPI-linked dimers) in nastaja predvsem v celicah hematopoetskega izvora. Katalitično podenoto T najdemo v topnih monomerih, dimerih, tetramerih in asimetričnih oblikah, nastaja pa v mišicah in možganih (57, 58). R oblika katalitične podenote naj bi tvorila monomerno AChE, ki se izloča iz celice, a njen obstoj še ni potrjen (59, 60).

AChE je glikoprotein. Sintetizira se na zrnatem endoplazmatskem retikulumu, hkrati s sintezo pa poteka tudi glikozilacija. V nekaj minutah poteče združevanje globularnih AChE v dimere in tetramere, ki gredo nato v Golgijev aparat (61, 62), kjer pride do sprememb na asparagin vezanih ogljikovih hidratov. Molekula se nato prenese na površino celice, kjer se sprosti kot sekretorna molekula ali pa ostane na površini membrane. Za nastanek asimetričnih oblik AChE je potrebno nekaj več časa, ob sprostitvi pa se

hitro vežejo na ekstracelularni matriks (61–63). Zdi se, da je celotna presnova AChE v celici lokalizirana okrog jeder, ki prepisujejo AChE mRNA (64).

#### Urnnavanje sinteze in celičnega prometa acetilholinesteraze

Urnnavanje sinteze AChE zagotavlja zadostno množino AChE v celici, posebni mehanizmi pa omogočajo tudi koncentriranje encima predvsem na področju ŽMS. Urnnavanje sinteze AChE poteka na različnih ravneh, in sicer na ravni transkripcije gena in potranskripcijskih dogodkov. Transport AChE in sidranje na določenih mestih urnnavata lokalno koncentracijo molekul AChE (1).

Transkripcija gena: Urnnavna se začetek prepisa gena in hitrost sinteze mRNA.

Potranskripcijski dogodki: V procesih od transkripcije do dokončne sinteze AChE obstaja veliko potencialnih regulacijskih mest, a njihov pomen v fizioloških procesih še ni pri vseh dokazan. Urnnavanje gotovo poteka na ravni različnega pripajanja primarnih transkriptov in verjetno je urnnavana tudi stabilnost molekul mRNA (65). Ni pa še veliko znanega o urnnavanju translacije in potranslacijskih dogodkov, kot so sestavljanje polipeptidov AChE in potranslacijska glikozilacija, dodajanje glikolipidov in kolagenskega repa.

Transport in sidranje molekul AChE: Verjetno je urnnavan transport ustrezne oblike AChE na ustrezno subcelično področje. Visoka koncentracija na mestu delovanja encima se doseže s specifičnim sidranjem heteromernih oblik AChE (45, 66).

Relativni pomen posamezne ravni urnnavanja sinteze AChE še ni znan (1), vsekakor pa se različni viri strinjajo, da se glavnina urnnavanja aktivnosti AChE izvaja na ravni njene mRNA (1, 67).

#### Urnnavanje ravni mRNA za acetilholinesterazo v skeletni mišici

V odrasli skeletni mišici podgane se AChE mRNA bolj koncentrira v področju ŽMS in to v sarkoplazmi neposredno pod postsinaptično membrano, prisotna pa je tudi drugod vzdolž mišičnih vlaken. Raven AChE mRNA je pomembno višja v hitrih mišicah kot v počasnih (27, 60, 67–69). Raven AChE

mRNA in s tem tudi samega encima je odvisna od več dejavnikov (70, 71), ki jih glede na izvor lahko razdelimo na živčne in mišične, vsi pa verjetno še niso znani (12). Glavna dejavnika urnnavanja ravni AChE mRNA, ki se pojavljata v literaturi, pa sta mišična aktivnost in neposredni vplivi živca.

Mišična aktivnost (mišično delo) (27, 67, 72–74). Na raven AChE mRNA v največji meri vpliva vzorec krčenja mišice, ki pa je v fizioloških razmerah odvisen od vzorca impulzov v motoričnem živcu. S poskusi na kulturi mišičnih celic so dokazali, da tudi pasivno krčenje in raztezanje mišičnih vlaken zviša raven AChE mRNA (12, 75). Tako v literaturi zasledimo tudi mnenje, da sami električni dražljaji živca ne regulirajo ravni AChE mRNA neposredno, ampak posredno prek krčenja mišic (76). Posrednik med krčenjem mišične celice in ekspresijo AChE mRNA bi lahko bil kalcijev ion, ki prehaja v celico po L-kanalčkih (77).

Neposredni živčni vplivi (68, 78). Živčno vlakno naj bi neposredno vplivalo na raven AChE mRNA v mišični celici s sproščanjem t. i. živčnih trofičnih dejavnikov v ŽMS. Obstoj in narava teh molekul sicer še nista dokazana, med mnogimi kandidati pa sta najbolj raziskana CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) in CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). S poskusi so dokazali, da sta ti dve molekuli sposobni urnnavati ekspresijo gena AChE v mišičnih celicah (70, 79–82).

#### Razgradnja acetilholinesteraze

O usodi molekul AChE po vezavi na površino celice ali na ekstracelularni matriks ni veliko znanega (1). Ugotovili so, da je razpolovna doba membransko vezanega encima približno 50 ur (62), encima v sinapsi pa 20 dni (83), iz česar lahko sklepamo na različne mehanizme razgradnje encima na površini celice oziroma v sinapsi. Na razlike v razgradnji globularnih in asimetričnih oblik AChE pa lahko sklepamo tudi iz različnega spreminjanja aktivnosti teh dveh oblik encima po denervaciji mišice (4, 41).

Mesto razgradnje AChE v celici še ni znano. Iz poskusov z inhibitorji lizosomskih encimov lahko sklepamo, da to lizosomi vsekakor niso. Večja je verjetnost, da vsaj del razgradnje AChE poteka v gladkem endoplaz-



matskem retikulumu, kar so pokazali z radi-oaktivnim označevanjem encima. Ali je to edino mesto razgradnje ali pa se encim raz-grajuje še drugje, bodo pokazali nadaljnji poskusi (84).

### **Presnova acetilholinesteraze po denervaciji**

Denervacija mišice pri podgani povzroči hiter upad skupne aktivnosti AChE v denervirani mišici (21, 30). Med hitrimi in počasnimi mišicami ter med področjem znotraj oziroma zunaj ŽMS pa obstajajo razlike v stopnji upa-da posameznih oblik encima. Različne oblike AChE imajo namreč različno hitre procese sinteze in razgradnje, kar v veliki meri vpliva na njihovo aktivnost v mišici po denervaciji (2, 21). Značilno je tudi, da po daljšem času (več tednov) po denervaciji lahko pride do ponovnega povišanja aktivnosti določenih oblik AChE (30).

#### **Spremembe aktivnosti acetilholinesteraze po denervaciji v mišici *extensor digitorum longus***

Skupna aktivnost AChE tako v področja ŽMS kot izven njega se v štirih dneh po denerva-ciji zmanjša, značilno pa je, da se začnejo aktivnosti AChE po več tednih spet večati.

V štirih dneh po denervaciji pride v področ-ju ŽMS do močnega zmanjšanja aktivnosti oblike A12 AChE, močno se zmanjša tudi aktivnost oblike G1, aktivnost oblike G4 pa se ohrani. V področju izven ŽMS se prav tako prehodno ohrani aktivnost oblike G4, zmanjša pa se aktivnost oblike G1. Asimetrične oblike AChE so v EDL v področju izven ŽMS že fiziološko odsotne (30).

#### **Spremembe aktivnosti acetilholinesteraze po denervaciji v mišici *soleus***

Tudi v SOL pride v štirih dneh po denerva-ciji do zmanjšanja skupne aktivnosti AChE. Štiri dni po denervaciji so v področju ŽMS ugotovili močno zmanjšano aktivnost oblike A12 AChE, aktivnost oblike A8 je nespreme-njena, oblike A4 pa povečana. Izven ŽMS so zmanjšane aktivnosti vseh oblik AChE, prisotne so tudi asimetrične oblike. Nekaj tednov po denervaciji se aktivnosti posameznih oblik AChE v področju ŽMS in izven njega izena-

čijo: največ je oblike G1, povečana je aktivnost oblike G4, zmanjšana pa aktivnost oblike A12 (30).

### **Presnova posameznih oblik acetilholinesteraze po denervaciji**

Iz izmerjenih aktivnosti posameznih oblik AChE v različnih časih po denervaciji miši-ce so lahko sklepali na možne mehanizme, ki povzročajo spremembe aktivnosti encima.

Oblika A12 AChE, ki je glavna oblika encima v ŽMS in se nahaja predvsem tu, je močno odvisna od inervacije mišice (2, 85, 86): po denervaciji pride do hitrega zmanjšanja aktivnosti te oblike encima, po reinervaciji pa se spet poveča (40, 87–91). Hitro zmanjšanje aktivnosti oblike A12 AChE v ŽMS je posledica razgradnje s proteolitičnimi encimi iz fagocitnih celic, ki pridejo na mesto degenera-cije prekinjenih živčnih končičev. V fizioloških razmerah ima oblika A12 AChE, ki je veza-na v bazalni lamini ŽMS, namreč zelo počasno presnovo. V poskusih, kjer so z botulinu-snim toksinom povzročili paralizo mišice in s tem inhibirali sintezo encima, živčni končič pa ni degeneriral, je prišlo do zelo počasne-ga zmanjševanja aktivnosti oblike A12 AChE v ŽMS (92, 93). Podoben rezultat so dosegli tudi z uporabo antiproteaz v denervirani mišici (85, 94). Tako pri poskusih z denerva-cijo, kot z uporabo botulinusnega toksina, pa so lahko ugotovili zmanjšano sintezo oblike A12 AChE in zmanjšano raven AChE mRNA v področju ŽMS hitre mišice (67, 93). Iz tega lahko sklepamo, da je za dovolj visoko ekspre-sijo AChE mRNA v mišici potrebna mišična aktivnost oziroma sproščanje ACh ali neke druge substance, ki se sprošča vzporedno z ACh.

Aktivnost oblike G1 AChE, ki se nahaja izven ŽMS, se hitro zmanjša v prvih dneh po denervaciji (95), kar je posledica močnega padca ravnih AChE mRNA, ki se zgodi v prvih 24–48 urah po denervaciji (27, 67). Do zni-žanja ravnih AChE mRNA izven ŽMS pride tudi po paralizi mišice z botulinusnim toksi-nom (2). Mišična aktivnost je torej potrebna za vzdrževanje zadostne ravnih AChE mRNA izven ŽMS.

V hitrih mišicah podgane pride kmalu po denervaciji do začasnega povečanja aktivnosti oblike G4 AChE izven ŽMS, verjetno

zaradi še nekaj časa neprekinjene sinteze te oblike encima iz obstoječih monomerov G1 AChE (30, 96, 97).

V počasnih mišicah podgane pride po denervaciji do zmanjšanja vseh oblik AChE izven ŽMS (30).

### **Presnova acetilholinesteraze ob električnem draženju oživčene ali denervirane mišice extensor digitorum longus**

Električno draženje skeletne mišice je eksperimentalni postopek, pri katerem z električnimi dražljaji sprožamo kontrakcije mišice in s tem opravljamo funkcijo, ki jo v fizioloških razmerah opravlja motorični živec. S spreminjanjem vzorca draženja lahko spreminjamo mišično aktivnost in s tem preučujemo njen vpliv na različne mišične lastnosti. Mišico lahko dražimo posredno prek motoričnega živca ali pa živec prekinemo in nato mišico dražimo neposredno, s čimer odstranimo vse dodatne vplive motoričnega živca. Rezultati draženja so odvisni od lastnosti mišice, ki jo dražimo, in od vzorca draženja.

Vsaka skeletna mišica je sestavljena iz več različnih vrst mišičnih vlaken, ki tvorijo motorične enote (24, 26). Mišico EDL tako sestavljajo štiri različne vrste hitrih mišičnih vlaken (24), ki tvorijo vsaj dve vrsti motoričnih enot (26, 98, 99). Vzorca aktivacije obeh vrst motoričnih enot EDL v prosto gibajočih se podganah se precej razlikujeta, a imata tudi skupne značilnosti, če ju primerjamo z vzorcem aktivacije motorične enote v mišici SOL. Za motorične enote FF (*fast fatigable*), ki se hitro krčijo in hitro utrudijo, je značilen vzorec aktivacije z majhnim številom dražljajev na dan (2.600–11.200), visoko frekvenco dražljajev (50–111 Hz), majhnim številom dražljajev v enem zaporedju dražljajev in dvakrat krajšim časovnim presledkom med prvima dvema dražljajema v zaporedju kot med ostalimi dražljaji. Motorične enote FR (*fast fatigue resistant*), ki se hitro krčijo, a so bolj vzdržljive, pa imajo vzorec aktivacije z večjim številom dražljajev na dan (89.500–243.100), nekoliko nižjo frekvenco dražljajev (40–100 Hz) in daljšimi zaporedji z več dražljaji. Mišico SOL pa sestavlja le ena vrsta motoričnih enot, ki se počasi krčijo, a so

zelo vzdržljive, za njihov fiziološki vzorec aktivacije pa je značilno veliko število dražljajev na dan (309.500–495.800), nizka frekvenca dražljajev (12–29 Hz) in zelo dolga zaporedja dražljajev (98, 99).

Vpliv določenega vzorca električnega draženja na določeno vrsto motorične enote je odvisen predvsem od razlik med tem vzorcem in fiziološkim vzorcem aktivacije te vrste motorične enote. Številni poskusi kažejo, da v splošnem vzorec draženja, ki je podoben fiziološkemu vzorcju aktivacije določene motorične enote, ohranja lastnosti te motorične enote po denervaciji, vzorec draženja, ki je različen od fiziološkega vzorca aktivacije določene motorične enote, pa povzroči spremembo lastnosti te motorične enote po denervaciji, vendar ne eno ne drugo ne velja vedno (98, 100).

V poskusih z električnim draženjem denervirane mišice so z uporabo vzorcev draženja, ki so podobni fiziološkemu vzorcju aktivacije različnih motoričnih enot, dokazali vpliv mišične aktivnosti na različne lastnosti mišice (98, 100). Dokazali so, da je vzorec mišične aktivnosti najpomembnejši dejavnik, ki uravnava aktivnost in oblike AChE ter raven AChE mRNA v mišicah EDL in SOL (2, 21, 27, 72, 74). S posrednim draženjem mišice EDL preko živca z vzorcem draženja, ki je značilen za mišico SOL, so povzročili zmanjšanje aktivnosti AChE v mišici (74). Dokazali so tudi, da vzorec draženja, ki je značilen za hitro mišico, zviša, medtem ko vzorec draženja počasne mišice zniža raven AChE mRNA v oživčeni skeletni mišici (27, 101, 102). V literaturi pa nismo zasledili raziskav, kjer bi z električnim draženjem denervirane mišice EDL uspeli obdržati vrednost aktivnosti AChE ali ravni AChE mRNA, tako da bi bila primerljiva z vrednostmi v oživčeni mišici.

### **NAMEN IN HIPOTEZA**

V raziskavi smo se namenili proučevati vpliv električnega draženja na raven AChE mRNA in aktivnost AChE v denervirani hitri mišici (EDL). Na živalskem modelu smo to mišico dražili z različnimi vzorci draženja, ki so značilni za hitre mišice in nato primerjali dobljene ravni AChE mRNA in aktivnosti AChE. Električno draženje denervirane mišice EDL



bi lahko imelo različen vpliv na vrednost ravni AChE mRNA ali aktivnosti AChE, zato smo s poskusi skušali preveriti naslednjo hipotezo:

Izbrani enostavni vzorec električnega draženja mišice EDL lahko delno prepreči spremembe ravni AChE mRNA ali spremembe aktivnosti AChE, ki nastanejo po denervaciji.

**UTEMELJITEV HIPOTEZE:** Elektromehanična aktivnost, sprožena prek živčnih impulzov, je v mišici ključna za uravnavanje aktivnosti AChE (76). Posledično pride pri podgani po denervaciji ali paralizi mišice v prvem tednu do padca ravni AChE mRNA in s tem zmanjšanja aktivnosti AChE na 30% normalne (21, 103–105). Znano je, da lahko električno draženje mišice vpliva na te spremembe (76). V literaturi pa ni podatkov, ali lahko električno draženje denervirane hitre mišice prepreči upad ravni AChE mRNA in zmanjšanje aktivnosti AChE, ter kakšna količina in vzorec draženja sta za to potrebna. Na podlagi dosedanjih izkušenj bi lahko na živalskem modelu preizkusili razpon različnih vzorcev draženja. Preko določanja ravni AChE mRNA in merjenja aktivnosti AChE bi lahko spremljali spremembe v mišici EDL z namenom, da odkrijemo tak vzorec draženja, ki lahko prepreči ali zmanjša podenervacijske spremembe ravni AChE mRNA in/ali aktivnosti AChE v mišici EDL.

## MATERIALI IN METODE

Po določitvi namena naloge in hipoteze je bilo potrebno zasnovati niz poskusov, s katerimi bi uspeli čim bolj neposredno in hkrati čim bolj racionalno potrditi ali ovreči hipotezo. Zaradi narave naloge, ki se ukvarja z zapleteno interakcijo med več tkivi, smo kot edino možnost izbrali poskus na živalih, pri čemer pa smo z natančnimi postopki in skrbnim ravnanjem skušali čim bolj zmanjšati nepotrebne izgube živali in njihovo trpljenje.

### Poskusne živali

Kot poskusne živali smo zaradi praktičnosti in dostopnosti uporabili bele podgane, soj Wistar. Tak izbor je pomemben tudi zaradi primerljivosti naših rezultatov z rezultati drugih avtorjev, ki so izvajali podobne poskuse na enakih poskusnih živalih. Iz istega

razloga smo uporabili samo samice. Živali so bile težke od 180 do 230 g.

Vse poskuse smo opravili na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, ki ima dovoljenje za poskuse na živalih v znanstveno-raziskovalne namene (Uradni list SRS, št. 40/85 in 22/87). Dovoljenje je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava R Slovenije (št. odločbe 326–07–26/98). Delo z živalmi je potekalo v skladu s predpisi, ki jih za to zahteva zakonodaja (Navodila o pogojih za izdajo dovoljenja za poskuse na živalih v znanstveno raziskovalne namene, Uradni list SRS, št. 322–03/85–74).

Živalim smo skušali zagotoviti bivalne pogoje, ki bi bili za vse čimbolj enaki in bi jih čim manj izpostavljali stresu. Podgane so bile v posebnem prostoru, ki je ogrevan in kjer se svetloba in tema menjavata na dvanajst ur. Vsaka je bila nameščena v ločeno kletko z dovolj hrane in vode.

### Postopki

Vse postopke, ki smo jih izvedli za pridobitev rezultatov, lahko razdelimo v pet skupin:

- denervacija in namestitve elektrod;
- električno draženje;
- izolacija mišice;
- meritve aktivnosti AChE;
- določitev ravni AChE mRNA.

Glede na to, da je operacija namestitve elektrod pri vsaki podgani zahtevala vsaj dve uri, smo največkrat operirali po štiri podgane v enem dnevu in jih nato skupaj obravnavali tudi naprej. Sledilo je električno draženje mišice, ki je trajalo po dnevu operacije še štiri do štiri in pol dni. Iz vsake živali smo nato izolirali draženo mišico EDL, iz druge zadnje okončine pa mišico EDL in mišico SOL. Aktivnost AChE smo določili v vsaki mišici posebej in sicer čimprej po koncu poskusa na posamezni skupini podgan. Draženo in kontrolno mišico EDL smo tudi stehali. Mišice za določanje ravni AChE mRNA pa smo najprej zmrznjene shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Šele ko smo imeli zbrane vzorce mišic iz vseh živali, smo v vseh istočasno določili raven AChE mRNA. Aktivnost AChE smo določili tudi v nenenervirani nedraženi mišici SOL iz vsake podgane. Izmerjeno vrednost smo lahko primerjali

z vrednostjo iz drugih poskusov in nam je omogočala kontrolo izvedbe merilnega postopka.

V naši nalogi smo skušali ugotoviti vpliv električnega draženja na mišico EDL, zato smo podgane razdelili na več skupin, pri katerih smo uporabili različne vzorce draženja:

#### I. Merjenje aktivnosti AChE:

Skupine od A1 do A7 (n = 38). Denervacija in električno draženje mišice po sedmih različnih vzorcih.

Skupina B (n = 6). Električno draženje mišice posredno preko živca z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in presledki med zaporedji dražljajev 15 min.

Skupina C (n = 7). Denervacija in namestitev elektrod brez električnega draženja.

Skupina D (n = 7). Namestitev elektrod brez denervacije in električnega draženja.

Vzorci draženja pri posameznih skupinah živali so opisani v tabeli 1.

Tabela 1. Skupine podgan, vzorci draženja in število živali, pri katerih smo določali aktivnost acetilholinesteraze v mišici extensor digitorum longus.

Skupina	Vzorec draženja (frekvenca / dolžina zaporedja / presledek)	Število živali
A1	100 Hz / 0,2 s / 10 min	7
A2	100 Hz / 1 s / 5 min	5
A3	150 Hz / 0,02 s / 90 s	5
A4	150 Hz / 0,2 s / 30 min	5
A5	150 Hz / 0,2 s / 15 min	6
A6	200 Hz / 0,2 s / 20 min	5
A7	200 Hz / 0,2 s / 4 min	5
B	živec, 150 Hz / 0,2 s / 15 min	6
C	denervacija, brez draženja	7
D	brez denervacije in draženja	7

#### II. Določanje ravni AChE mRNA:

Skupini E1 in E2 (n = 12). Denervacija in električno draženje mišice po dveh različnih vzorcih.

Skupina F (n = 6). Denervacija in namestitev elektrod brez električnega draženja.

Skupina G (n = 6). Namestitev elektrod brez denervacije in električnega draženja.

Vzorci draženja pri posameznih skupinah živali so opisani v tabeli 2.

Tabela 2. Skupine podgan, vzorci draženja in število živali, pri katerih smo določali raven mRNA za acetilholinesterazo v mišici extensor digitorum longus.

Skupina	Vzorec draženja (frekvenca / dolžina zaporedja / presledek)	Število živali
E1	150 Hz / 0,2 s / 15 min	6
E2	150 Hz / 0,02 s / 90 s	6
F	Denervacija, brez draženja	6
G	Brez denervacije in draženja	6

#### Denervacija in namestitev elektrod

Podgano smo stehali na elektronski tehtnici in nato glede na težo po posebni tabeli določili količino potrebnega anestetika. Pri tej operaciji in tudi pri izolaciji mišice smo uporabili kombinacijo dveh anestetikov in sicer ksilazin hidroklorid in ketamin hidroklorid.

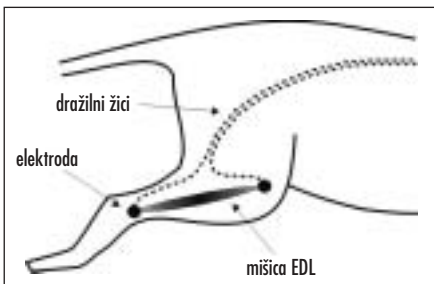
Podgano smo držali z levo roko od zadaj preko prsnega koša, z desno roko pa smo prijeli zadnji okončini in ji intraperitonealno vbrizgali anestetik. Nato smo jo dali v temno posodo, kjer je po največ petih minutah zaspala. En odmerek anestetika je deloval približno tri ure, kar je običajno zadoščalo za ves poseg.

Po anesteziji smo podgano obrili na mestih, kjer so pri operaciji potekale incizije, jo namestili na operacijsko mizico v trebušni legi in ji fiksirali okončine z elastikami. Uporabljali smo grelne operacijske mizice, ki so termostatirane in uravnavajo telesno temperaturo živali glede na senzor, ki je ves čas nameščen v rektumu. Ves čas anestezije smo podganam vlažili oči s fiziološko raztopino, da se zaradi gretja in odsotnosti mežikanja ne bi izsušile.

Sledil je sam kirurški poseg, ki ga lahko opišemo v več točkah:

- incizija kože na zadnji okončini; s pomočjo pincete in škarij smo prerezali kožo na zunanjem delu desne zadnje okončine vzdolžno od kolčnega do skočnega sklepa.
- izprepariranje ishiadičnega živca in denervacija; Skozi fascijo med dvema mišičnima skupinama medialno od kolka smo si prikazali ishiadični živec in odrezali približno 1 cm dolg odsek le-tega. Pri podganah skupine B pa smo živec ohranili, na eno in

- drugo stran živca smo namestili dražilni elektrodi ter ju pritrdili na spodaj ležeče mišice.
- izprepariranje mišice EDL; Najprej smo mobilizirali in razmaknili kožo na goleni, prerezali povrhnjo in globljo mišično skupino, ju mobilizirali, in v tretji plasti se je prikazala mišica EDL, ki smo jo previdno ločili od ostalih mišic.
  - namestitev elektrod za električno draženje; Prikazali smo si oba konca mišice EDL in nato na sosednji mišici s po enim šivom pritrdili posamezno elektrodo. Proksimalno elektrodo smo pritrdili na proksimalni medialni del mišice, ki leži lateralno od EDL, distalno elektrodo pa na distalni lateralni del mišice, ki leži medialno od EDL. Konca vsake elektrode sta tako ležala tik ob EDL, a pritrdjena na kiti sosednjih mišic, same mišice EDL namreč nismo smeli poškodovati (slika 1).
  - zašitje mišic; Po pritrditvi elektrod smo z nekaj šivi spet približali mišice zgornjih dveh plasti in s tem pokrili EDL, med šivi pa sta izstopali obe žici elektrod.
  - napeljava notranje dražilne žice; Na zatilju podgane smo naredili prečni rez kože v dolžini 2–3 cm in nato s pomočjo pince izpreparirali podkožni kanal od zatilja do rane na zadnji okončini. Skozenj smo napeljali notranjo dražilno žico od elektrod in jo na zadnji okončini še fiksirali na mišice s šivom. Kožo na okončini smo speli s kovinskimi sponkami, na zatilju pa zašili, tako da je skozi kožo izstopal le še konektor notranje dražilne žice.



Slika 1. Električno draženje denervirane mišice extensor digitorum longus pri podgani. Dražilni elektrodi sta s šivoma pritrdjeni tik ob narasliščih mišice extensor digitorum longus. Notranji dražilni žici potekata v podkožnem kanalu do zatilja, kjer sta preko konektorja priključeni na zunanjo dražilno žico.

- pritrditev zunanje dražilne žice; Zunanjo dražilno žico smo priključili na konektor na zatilju in jo fiksirali z lepilom in šivi. Podgani smo okoli vratu namestili in prilepili še obroč iz plastičnega materiala, ki je preprečeval, da bi žival dosegla zunanjo dražilno žico.

Po končani operaciji smo še počakali, da se je podgana popolnoma prebudila in nato smo jo lahko prenesli v kletko za draženje.

### Električno draženje

Draženje mišic je potekalo v prirejenih plastičnih kletkah s priključkom za zunanjo dražilno žico, preko katere se je dražljaj prevajal do elektrod na mišici. Draženje je potekalo po metodi, ki jo je razvil Rozman s sodelavci (106), kot generator dražljajev pa smo uporabili 5 kanalni tokovni dražilec izdelan na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Mišice smo dražili z zaporedji enakih tokovnih dvofaznih dražljajev (dolžina dražljaja 0,2 ms), med zaporedji pa so bili enako dolgi presledki. Pri tem smo lahko nastavljali amplitudo posameznega dražljaja za vsak kanal posebej, frekvenco dražljajev, dolžino zaporedja dražljajev in trajanje presledka med zaporedji dražljajev pa za vse kanale skupaj. Pri različnih skupinah podgan smo uporabili različne vzorce draženja, pri čemer smo spreminjali frekvenco dražljajev, dolžino zaporedij dražljajev in časovne presledke med zaporedji dražljajev (tabeli 1 in 2). Amplitudo dražljajev smo nastavili za vsako podgano posebej, a v območju od 5 do 15 mA. Celotno draženje je trajalo približno 4 dni. Med tem časom smo podgane vsakodnevno opazovali in po potrebi prilagajali amplitudo draženja tako, da je vsak dražljaj povzročil vidno skrčenje okončine, ki pa podgani ni povzročilo bolečine. Peti dan smo draženje prekinili in podgane odnesli v laboratorij za izolacijo mišic.

### Izolacija mišice

Takoj po prenehanju draženja je bilo potrebno iz podgan odstraniti mišici EDL in SOL. Podgane smo anestezirali z etrom, v aseptičnih razmerah iz zadnje okončine odstranili draženo mišico EDL, iz druge zadnje okončine pa mišico EDL in mišico SOL. V nadaljnjem

postopku smo uporabili samo mišice brez znakov vnetja ali poškodbe. Mišice smo očistili vsega veziva, jih stehtali, zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri približno  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Meritve aktivnosti acetilholinesteraze**

Aktivnost AChE v posameznih mišicah smo izmerili s spektrofotometrom. Mišice smo najprej odmrznili na ledu, kar je trajalo približno 45 minut za povprečno (90mg) težko mišico, nato pa smo jih homogenizirali v 1 % raztopini acetilfenol polietilenglikol etra v fosfatnem pufru. Homogenat smo prenesli v 1,5 ml ependorfke in ga centrifugirali 15 min pri 10.000 obratih/min pri temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo prenesli v penicilinko na ledu, mu dodali substrat (0,01 M raztopina acetilholin jodida v destilirani vodi) in nato večkrat izmerili absorbcijo v spektrofotometru pri  $\gamma = 413\text{ nm}$ . Iz izmerjenih vrednosti absorbcije smo izračunali aktivnost AChE za posamezen vzorec.

### **Določanje ravni mRNA za acetilholinesterazo**

Ravni AChE mRNA ni bilo mogoče določiti v vsaki mišici posebej, saj je za postopek potrebnega več tkiva, kot ga dobimo z eno mišico. Zato smo po tri mišice, ki so bile dražene z enakim vzorcem draženja, združili v en vzorec. Na ta način smo iz vsake skupine šestih podgan dobili po dva vzorca, vsak vzorec razpolovili in v vsakem delu posebej določili raven AChE mRNA po metodi Northern-blot. Tako smo za vsako skupino podgan dobili štiri ravni AChE mRNA, kar nam je omogočalo kontrolo izvedbe postopka.

Za določanje ravni AChE mRNA smo uporabili metodo Northern-blot (107), ki je le semikvantitativna. Rezultati, ki jih dobimo, niso absolutne vrednosti koncentracij, ampak so podani kot relativne vrednosti ravni AChE mRNA v vzorcu glede na raven v kontrolnem vzorcu. Postopek metode Northern-blot lahko razdelimo na štiri stopnje: izolacija mRNA iz tkiva, elektroforeza in *blotting*, markiranje sonde in hibridizacija ter ekspaniranje filma.

### **Izolacija RNA iz tkiva**

Zmrznjene mišice smo ob stalnem hlajenju s tekočim dušikom najprej strli v terilniku in

nato homogenizirali v denaturacijski raztopini s homogenizatorjem pri 4000–10.000 obratih/minuto. Homogenat smo nato suspendirali v mešanici Na-acetata, fenola, kloroforma in izoamilalkohola, centrifugirali 20 min pri 12.000 G in  $4^{\circ}\text{C}$ , supernatantu dodali iso-propanol, centrifugirali pri enakih pogojih, nato pa oborini dodali iso-propanol in še enkrat centrifugirali. Belo oborino smo resuspendirali v 75 % etanolu, centrifugirali 10 min pri 10.000 G pri  $4^{\circ}\text{C}$ , nato odstranili supernatant, oborino vakuumsko osušili v eksikatorju in jo raztopili v vodi. Raztopini celotne RNA smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo in jo dodatno razredčili do končne koncentracije  $6\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Raztopino RNA smo shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Celoten postopek izolacije RNA za en vzorec je trajal približno sedem ur.

### **Elektroforeza in blotting**

Raztopino celotne RNA smo nato ločili z elektroforezo v 1,2 % denaturirajočem formaldehid-agaroznem gelu v 4–5 urah pri napetosti 60–80 V. Z gela smo RNA s kapilarnim pivnanjem prepivnali na najlonsko membrano, jo posušili, fiksirali na UV transiluminatorju in shranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Markiranje sonde in hibridizacija**

Za hibridizacijo AChE mRNA smo uporabili specifične sonde DNA, ki ustrezajo odseku c-DNA podganje katalitične podenote AChE. Za označevanje sonde z  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  dCTP smo uporabili komponente kita »random prime«. Kot začetni oligonukleotid smo uporabili specifične sintetične oligonukleotide, komplementarne 3' koncu sonde. Hibridizacija je potekala pri  $42^{\circ}\text{C}$  preko noči v raztopini z dodatkom radioaktivne sonde do  $\sim 10^6\text{ cpm/ml}$ . Blote smo nato pri sobni temperaturi večkrat izprali.

### **Ekspaniranje filma**

Hibridizirane in sprane membrane smo postavili na fotografski film za 1–4 dni. Membrane smo nato obarvali z metilenskim modrilom, da se je prikazala RNA, še posebej dva pasova ribosomne RNA, kar nam je služilo za kontrolo enakomernosti nanosa RNA na gel, kvaliteto prepivnanja in za normiranje.

Dobljene slike na fotografskem filmu so predstavljale rezultat, iz katerega smo lahko

vizualno ocenili raven AChE mRNA v posameznem vzorcu.

### Statistične metode

Po opravljenih meritvah smo rezultate statistično obdelali s pomočjo računalniških programov Excel (Microsoft) in Statist (Inštitut za patološko fiziologijo).

Ločeno smo obdelali večjo skupino podgan, pri kateri smo merili aktivnost AChE v mišici in maso mišic. Pri vsaki posamezni podgani smo najprej izračunali razmerje med aktivnostjo AChE v draženi in nedraženi mišici EDL. S tem smo izničili vpliv razlik v aktivnosti AChE med različnimi podganami, ki so bile prisotne že pred poskusom, na rezultate poskusa ob predpostavki, da sta aktivnosti AChE v enaki mišici leve in desne zadnje okončine v fizioloških pogojih približno enaki. Nato smo izračunali povprečje in standardno deviacijo teh razmerij aktivnosti za vse podgane, ki so bile dražene po enakem vzorcu. Na enak način smo obdelali tudi meritve mase mišic.

V drugi, manjši skupini podgan, kjer smo določali raven AChE mRNA, pa je posamezna ocena pri določenem vzorcu draženja že predstavljala končni rezultat.

Rezultate meritev smo zaradi velikih razlik med variancami statistično ovrednotili z neparametričnima testoma in sicer s Kruskal-Wallisovim testom in neparnim Wilcoxonovim testom. Razliko med dvema vzorcema smo imeli za statistično značilno, če je bila stopnja tveganja za veljavnost ničelne hipoteze manjša od 5 % ( $p < 0,05$ ).

## REZULTATI

### Vpliv električnega draženja na aktivnost acetilholinesteraze v denervirani mišici extensor digitorum longus

Rezultati teh meritev so predstavljeni v tabeli 3.

Prav v vseh skupinah podgan je prišlo v denervirani mišici do pomembnega upada aktivnosti AChE v primerjavi z nedenervirano mišico druge zadnje okončine.

Skupina mišic, ki so bile denervirane, a ne dražene (skupina C), predstavlja kontrolno skupino, glede na katero lahko presojamo uspešnost različnih vzorcev električnega draženja. V tej skupini je povprečna vrednost aktivnosti AChE upadla na 52,8 % vrednosti v nedenervirani mišici druge zadnje okončine.

Različni vzorci električnega draženja so bili različno uspešni v preprečevanju upada aktivnosti AChE v denervirani mišici. Največjo povprečno vrednost aktivnosti AChE, in sicer 65,6 % vrednosti v nedenervirani mišici druge zadnje okončine, smo dosegli z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, z dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min (skupina A5).

Najmanjšo povprečno vrednost aktivnosti AChE smo izmerili v mišicah, ki smo jih dražili z vzorcem draženja s frekvenco 100 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 1 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 5 min.

V normalno oživčenih mišicah EDL (skupina B), ki smo jih še dodatno dražili posredno preko živca z vzorcem draženja, ki je najbolj

Tabela 3. Razmerje med aktivnostima acetilholinesteraze v denervirani draženi mišici extensor digitorum longus (EDLstim) in normalno oživčeni kontralateralni mišici extensor digitorum longus (EDLkont) pri različnih vzorcih draženja.

Skupina podgan	Vzorec draženja (vrsta draženja // št. dražljajev na dan)	Razmerje aktivnosti encima EDLstim/EDLkont	Standardna deviacija
C	denervirane, brez draženja, 4 dni	0,528	± 0,028
A1	100 Hz, 0,2 s / 10 min // 2880	0,535	± 0,0712
A2	100 Hz, 1 s / 5 min // 28800	0,444	± 0,0939
A3	150 Hz, 0,02 s / 90 s // 2880	0,5466	± 0,088
A4	150 Hz, 0,2 s / 30 min // 1440	0,531	± 0,04453
A5	150 Hz, 0,2 s / 15 min // 2880	0,6557	± 0,0756
A6	200 Hz, 0,2 s / 20 min // 2880	0,534	± 0,027
A7	200 Hz, 0,2 s / 4 min // 14400	0,517	± 0,0627
B	živec, 150 Hz, 0,2 s / 15 min // 2880	0,7993	± 0,0433



uspešno preprečil zmanjšanje aktivnosti AChE v denerviranih mišicah, smo izmerili aktivnost AChE, ki je znašala 79,9 % vrednosti v oživčenih mišicah druge zadnje okončine. To je večja aktivnost AChE kot v vseh denerviranih in draženih mišicah, a manjša kot v oživčenih mišicah v fizioloških razmerah.

Rezultate meritev aktivnosti AChE smo zaradi velikih razlik med variancami statistično ovrednotili z neparametričnima testoma.

V prvem delu smo s Kruskal-Wallisovim testom skušali potrditi hipotezo, da se vrednosti aktivnosti AChE pri različnih skupinah podgan od A1 do A7 in C pomembno razlikujejo med seboj. Stopnja tveganja za veljavnost ničelne hipoteze je pri tem znašala pod 5 % ( $p < 0,05$ ), kar potrjuje našo hipotezo.

V drugem delu pa smo z neparnim Wilcoxonovim testom skušali ugotoviti statistično pomembne razlike v aktivnosti AChE v parih testnih skupin podgan. Rezultati te analize so prikazani v tabeli 4.

Tabela 4. Rezultati neparnega Wilcoxonovega testa za vrednosti aktivnosti acetilholinesteraze v mišicah različnih skupin podgan. (Skupine so opisane v tabeli 1.) V levem stolpcu so pari skupin podgan, pri katerih smo primerjali vrednosti aktivnosti acetilholinesteraze, v desnem stolpcu pa stopnja tveganja za veljavnost ničelne hipoteze.

Primerjane skupine podgan	p (%)
A5 : C	$p < 1$
A5 : A1	$p < 1$
A5 : A2	$p < 1$
A5 : A3	$p < 1$
A5 : A4	$p < 1$
A5 : A6	$p < 1$
A5 : A7	$p < 1$

Z neparnim Wilcoxonovim testom smo ugotovili, da se vrednosti aktivnosti AChE pri skupini A5 (denervirane in dražene mišice z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min) pomembno razlikujejo od aktivnosti pri denerviranih nedraženih mišicah (skupina C) in denerviranih mišicah, draženih z drugačnimi vzorci draženja (skupine A1, A2, A3, A4, A6, A7).

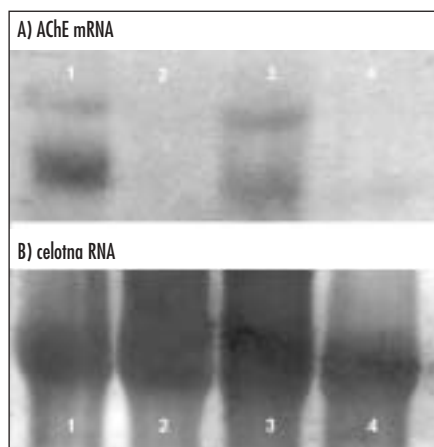
## Vpliv električnega draženja na raven mRNA za acetilholinesterazo v denervirani mišici extensor digitorum longus

Rezultati določanja ravni AChE mRNA z metodo Northern-blot so prikazani na sliki 2.

V vseh skupinah denerviranih mišic je prišlo do upada ravni AChE mRNA glede na nedenervirano mišico.

Vzorec draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min (skupina A5), ki je povzročil najmanjše zmanjšanje aktivnosti AChE v denerviranih mišicah, je bil najbolj uspešen tudi v preprečevanju padca ravni AChE mRNA (skupina E1).

Z drugačnim vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,02 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 90 s (skupina E2) smo dosegli bistveno nižjo raven AChE mRNA, ki se pomembno ne razlikuje od ravni pri denerviranih nedraženih mišicah (skupina F).



Slika 2. Radioaktivna Northern-blot analiza mRNA za acetilholinesterazo in celotne RNA iz vzorca mišice extensor digitorum longus pri štirih različnih skupinah podgan. V vsakem vzorcu (1 do 4) so bile po tri mišice.

- 1 kontrolne mišice – skupina G;
- 2 denervirane in nedražene mišice – skupina F;
- 3 denervirane mišice, dražene z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med dražljaji 15 min – skupina E1;
- 4 denervirane mišice, dražene z vzorcem draženja s frekvenco 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,02 s in trajanjem presledka med dražljaji 90 s – skupina E2.

## Vpliv električnega draženja na maso denerviranih mišic *extensor digitorum longus*

Rezultati teh meritev so predstavljeni v tabeli 5.

V kontrolni skupini denerviranih, a nedraženih mišic (skupina C) se povprečna vrednost mase mišic EDL ni spremenila glede na povprečno vrednost mase nedenerviranih kontralateralnih mišic ( $p > 0,05$ ).

V vseh skupinah denerviranih in draženih mišic EDL (skupine A1 do A7), se je povprečna vrednost mase le-teh statistično značilno povečala nad povprečno vrednost mase nedenerviranih mišic druge zadnje okončine ( $p < 0,01$ ).

Povprečno razmerje mas med denervirano draženo mišico in kontralateralno normalno oživčeno mišico vsake od skupin denerviranih in draženih mišic (skupine A1 do A7) je statistično značilno večje od povprečnega razmerja mas pri denerviranih nedraženih mišicah (skupina C) ( $p < 0,05$ ).

## RAZPRAVLJANJE

V raziskavi smo proučevali vpliv električnega draženja na aktivnost AChE in raven AChE mRNA v denerviranih hitrih mišicah pri podgani. Mišice EDL smo najprej denervirali s prekinitivjo ishiadičnega živca in jih nato štiri dni neposredno dražili z različnimi vzorci električnih dražljajev. V mišicah smo nato izmerili aktivnost AChE in ocenili raven AChE mRNA ter ju primerjali z vrednostmi v enakih mišicah druge zadnje okončine.

## Vpliv električnega draženja na aktivnost acetilholinesteraze v denervirani mišici *extensor digitorum longus*

Rezultati merjenja aktivnosti AChE v denerviranih mišicah EDL, ki smo jih neposredno električno dražili z različnimi vzorci draženja nam kažejo, da je možno z ustreznim vzorcem draženja pomembno zmanjšati upad aktivnosti AChE v EDL po denervaciji. Na aktivnost AChE je najbolj vplival vzorec draženja s frekvenco dražljajev 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min. S tem vzorcem draženja v štirih dneh po denervaciji povprečna vrednost aktivnosti AChE upade na 65,6 % vrednosti v nedenervirani mišici. Ostali uporabljene vzorci draženja so bili manj uspešni v preprečevanju zmanjšanja aktivnosti AChE v EDL po denervaciji.

Pri eni skupini podgan smo nedenervirane mišice EDL dražili posredno preko ishiadičnega živca z vzorcem draženja, ki je najbolj uspešno preprečil zmanjšanje aktivnosti AChE pri denerviranih mišicah, to je vzorec s frekvenco draženja 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min. S tem načinom draženja smo dosegli aktivnost AChE, ki je znašala le 78,8 % aktivnosti v oživčenih nedraženih mišicah EDL. Zmanjšanje aktivnosti AChE v EDL zaradi draženja kljub prisotnosti fiziološke inervacije mišice nam dokazuje, da uporabljeni vzorec draženja ni bil optimalen oziroma dovolj podoben fiziološkemu vzorcu aktivacije mišice.

Tabela 5. Razmerje med masama denervirane dražene mišice *extensor digitorum longus* (EDLstim) in normalno oživčene kontralateralne mišice *extensor digitorum longus* (EDLkont) pri različnih vzorcih draženja.

Skupina podgan	Vzorec draženja (vrsta draženja // št. dražljajev na dan)	Razmerje aktivnosti encima EDLstim/EDLkont	Standardna deviacija
C	denervirane, brez draženja, 4 dni	0,988	± 0,081
A1	100 Hz, 0,2 s / 10 min // 2880	1,248	± 0,189
A2	100 Hz, 1 s / 5 min // 28800	1,268	± 0,344
A3	150 Hz, 0,02 s / 90 s // 2880	1,273	± 0,15
A4	150 Hz, 0,2 s / 30 min // 1440	1,222	± 0,0831
A5	150 Hz, 0,2 s / 15 min // 2880	1,205	± 0,196
A6	200 Hz, 0,2 s / 20 min // 2880	1,268	± 0,082
A7	200 Hz, 0,2 s / 4 min // 14400	1,158	± 0,239
B	živec, 150 Hz, 0,2 s / 15 min // 2880	1,118	± 0,0684

Uspešnost draženja denerviranih mišic smo lahko do določene mere preverili tudi z merjenjem mase mišice EDL po končanem draženju in primerjanjem vrednosti z maso nedenervirane mišice v drugi zadnji okončini. Pri denerviranih nedraženih mišicah v štirih dneh še ni prišlo do pričakovanega zmanjšanja mase mišice v primerjavi z maso nedenervirane mišice v drugi zadnji okončini. Vzrok za to je verjetno prekratko trajanje stanja denervacije mišic, tako da se atrofične spremembe še niso izrazile. V vseh skupinah denerviranih draženih mišic, se je povprečna vrednost mase mišic statistično značilno povečala nad povprečno vrednost mase nedenerviranih mišic druge zadnje okončine. Poleg tega je povprečno razmerje mas med denervirano draženo mišico in kontralateralno normalno oživčeno mišico vsake od skupin denerviranih in draženih mišic statistično značilno večje od povprečnega razmerja mas pri denerviranih nedraženih mišicah. Ti rezultatov dokazujejo, da so bile mišice res električno dražene.

### **Vpliv električnega draženja na raven mRNA za acetilholinesterazo v denervirani mišici *extensor digitorum longus***

Tudi z določanjem ravni AChE mRNA v denerviranih mišicah EDL, ki smo jih neposredno električno dražili z različnima vzorcema draženja, smo dokazali, da lahko z ustreznim vzorcem draženja pomembno zmanjšamo upad ravni AChE mRNA. Pri tem se je kot uspešen izkazal isti vzorec draženja, ki je bil uspešen tudi v preprečevanju zmanjšanja aktivnosti AChE v EDL po denervaciji, to je vzorec s frekvenco draženja 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 15 min. Raven AChE mRNA, ki smo jo določili pri drugačnem vzorcu draženja s frekvenco draženja 150 Hz, dolžino zaporedja dražljajev 0,02 s in trajanjem presledka med zaporedji dražljajev 90 s, se ne razlikuje bistveno od vrednosti v denervirani nedraženi EDL.

Pri najbolj uspešnem vzorcu draženja denervirane mišice EDL (frekvenca draženja 150 Hz, dolžina zaporedja dražljajev 0,2 s in trajanje presledka med zaporedji dražljajev 15 min), je prišlo hkrati do povečanja aktiv-

nosti AChE in porasta ravni AChE mRNA nad nivo v denervirani nedraženi mišici EDL. Iz tega lahko sklepamo, da je za relativno povečanje aktivnosti AChE vsaj deloma odgovorna zvišana raven AChE mRNA in s tem relativno zvečana sinteza AChE. Pomena razgradnje AChE pri tem ne moremo oceniti.

### **Primerjava rezultatov naloge z rezultati drugih raziskovalnih skupin**

V razpoložljivi literaturi se pojavljajo številni poskusi, v katerih so skušali z uporabo različnih vzorcev električnega draženja na denervirani mišici (EDL, SOL in drugih) ohraniti ali spremeniti različne lastnosti denervirane mišice (27, 74, 98, 100).

Dokazali so, da je mogoče z električnim draženjem denervirane mišice EDL, ki simulira fiziološki vzorec aktivacije te mišice, vsaj delno vzdrževati normalne vrednosti različnih kontraktilnih in biokemičnih lastnosti EDL, kot so sila in hitrost kontrakcije, aktivnosti in oblike različnih beljakovin in encimov presnove (98, 100).

V poskutih v tej nalogi nam z električnim draženjem denervirane mišice EDL kljub uporabi razmeroma fiziološkega vzorca kontrakcij ni uspelo popolnoma vzdrževati normalne aktivnosti AChE. Izkazalo se je tudi, da je vpliv električnega draženja na aktivnost AChE zelo odvisen od uporabljenega vzorca draženja, kar velja tudi za druge kontraktilne in biokemične lastnosti mišice (98, 100).

Z električnim draženjem denervirane mišice EDL s fiziološkim vzorcem dražljajev nam tudi ni uspelo popolnoma preprečiti padca ravni AChE mRNA pod nivo v nedenervirani mišici.

V poskutih smo za draženje denervirane EDL uporabili različne vzorce draženja, ki so bili vsi precej podobni fiziološkemu vzorcu kontrakcij te mišice *in vivo* (98, 99), hkrati pa so se uporabljeni vzorci med seboj razlikovali v treh različnih parametrih (frekvenca dražljajev, dolžina zaporedja dražljajev, časovni presledki med posameznimi zaporedji dražljajev). Ker nam z nobenim od teh vzorcev ni uspelo popolnoma ohraniti aktivnosti AChE ali ravni AChE mRNA na nivoju vrednosti v normalno oživčeni mišici EDL, lahko

s precejšnjo gotovostjo trdimo, da normalne aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v denervirani EDL ni mogoče doseči z nobenim enostavnim vzorcem draženja. V literaturi se pojavljajo še drugi primeri električnega draženja denervirane hitre mišice z uporabo enostavnih vzorcev draženja, kjer jim ni uspelo ohraniti normalnih različnih lastnosti hitre mišice (98, 108–110).

### **Dejavniki uravnavanja aktivnosti acetilholinesteraze v skeletni mišici**

Rezultati te raziskave nas tako pripeljejo do vprašanja uravnavanja aktivnosti AChE v skeletni mišici, s katerim so se ukvarjali že številni raziskovalci pred nami (2, 8, 12, 21, 24, 27, 30, 67, 72, 74, 93). Kot že rečeno v uvodu, poteka večina uravnavanja aktivnosti AChE v skeletni mišici preko uravnavanja ravni njene mRNA (67), na slednjo pa vplivata vzorec mišične aktivnosti in neposredni vplivi motoričnega živca (12, 27, 67, 72, 74). Na obeh področjih bi bilo treba iskati dodatne dejavnike, ki so bili v naših poskusih po denervaciji EDL odsotni, in zato samo z enostavnim električnim draženjem ni bilo mogoče doseči vrednosti aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA, kakršne so v normalno oživčeni mišici.

Po eni strani bi bilo mogoče uporabiti še drugačne vzorce električnega draženja EDL. S poskusi so že dokazali, da je vzorec električnega draženja, v katerem je časovni razmak med prvim in drugim dražljajem pol krajši kot med ostalimi dražljaji v zaporedju, bolj uspešen v vzdrževanju normalnih kontraktilnih in biokemičnih lastnosti denervirane EDL od enostavnih vzorcev draženja (98, 100). Mogoče bi bili takšen in še drugi bolj zapleteni vzorci draženja bolj uspešni tudi v vzdrževanju normalne aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v denervirani EDL. Nove vzorce bi lahko iskali in preizkušali s posrednim draženjem EDL preko živca, saj optimalni vzorec pri tem načinu draženja ne bi povzročil zmanjšanja aktivnosti AChE in padca ravni AChE mRNA.

Obstaja pa tudi možnost, da z električnim draženjem cele denervirane mišice EDL z nobenim vzorcem draženja ni mogoče doseči aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA kot v nedenervirani mišici. Mišica EDL je

namreč sestavljena iz vsaj dveh vrst motoričnih enot, ki se v fizioloških pogojih aktivirajo ločeno in po različnih vzorcih (98, 99). Ob predpostavki, da je za vzdrževanje normalne aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v denervirani motorični enoti v EDL potrebno draženje motorične enote z zanjo specifičnim vzorcem draženja, potem z draženjem celotne mišice z enim vzorcem draženja ni mogoče optimalno dražiti vseh motoričnih enot hkrati. Z enim vzorcem draženja zato morda tudi ne moremo doseči normalne aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v vseh motoričnih enotah hkrati.

Drugi pomemben dejavnik, ki poleg mišične aktivnosti vpliva na raven AChE mRNA in s tem tudi na aktivnost AChE v mišici EDL, so neposredni vplivi motoričnega živca. Kot je že omenjeno v uvodu, prisotnost in pomen teh vplivov nista nesporno dokazana, najverjetnejša možnost uravnavanja pa je sproščanje t. i. živčnih trofičnih dejavnikov v ŽMS (68, 78). Kot možna mediatorja se v literaturi pojavljata predvsem CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) in CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), ki sta sposobna uravnati izražanje gena za AChE v mišičnih celicah (79–81). Možno je torej, da samo električno draženje oziroma mišična aktivnost EDL ni dovolj za vzdrževanje normalne aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v mišici, ampak je za to neobhodno potrebna prisotnost enega ali več živčnih trofičnih dejavnikov.

Iz zgoraj navedenega sledi, da bi v nadaljnjih raziskavah uravnavanja aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v mišici EDL lahko uporabili tri nove pristope, in sicer: uporabo zapletenejših vzorcev draženja, ločeno draženje posameznih motoričnih enot in dodajanje različnih živčnih trofičnih dejavnikov denervirani mišici. Na ta način bi lahko v ločenih poskusih bolje ovrednotili pomen mišične aktivnosti in živčnih dejavnikov v uravnavanju aktivnosti AChE in ravni AChE mRNA v mišici EDL.

V raziskavi smo pokazali, da lahko z električnim draženjem denervirane hitre mišice EDL pri podgani delno preprečimo zmanjšanje aktivnosti AChE in upad ravni AChE mRNA, ki običajno nastopi po denervaciji mišice. Vendar pa je bil učinek uporabljenih vzorcev električnega draženja samo delen, saj

se aktivnost AChE in raven AChE mRNA vseeno občutno zmanjšata, hkrati pa je učinek zelo odvisen od vzorca draženja. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se aktivnost AChE in raven AChE mRNA v mišici EDL ne uravnava le z enostavno mišično aktivnostjo, ampak v uravnavanju sodelujejo zapletenejši vzorci aktivacije mišice ali pa posebni kemični mediatorji, najverjetneje pa oboji.

Dejstvo, da je glavni predmet raziskav v tej nalogi denervirana skeletna mišica, ji daje tudi klinični pomen. Sodi namreč v veliko skupino raziskav, ki se ukvarjajo z vprašanjem, kako po okvari motoričnega živca zaradi kateregakoli razloga (poškodba, bolezen) preprečiti podnervacijske spremembe mišice. Ena od možnih rešitev je prav neposredno električno draženje denervirane mišice, ki smo ga uporabili v tej raziskavi, vendar pa je učinek močno odvisen od pravilne izbire vzorca draženja. Šele prihodnje raziskave bodo pokazale, ali je možno z uporabo optimalnega vzorca draženja in ob morebitnem dodajanju živčnih trofičnih dejavnikov obdržati fiziološke lastnosti denervirane mišice v času regeneracije živca, in tako omogočiti bolniku hitrejšo okrevanje.

## ZAKLJUČKI

1. Potrdili smo našo hipotezo, ker smo dokazali, da obstaja enostaven vzorec električnega draženja mišice EDL, ki lahko delno prepreči podnervacijske spremembe tako ravni AChE mRNA kot aktivnosti AChE.
2. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se raven AChE mRNA in aktivnost AChE v mišici EDL ne uravnava le z enostavno mišično aktivnostjo, uporabljeno v naših poskusih. Pri vzdrževanju normalne ravni

AChE mRNA in aktivnosti AChE v hitri mišici v fizioloških razmerah verjetno sodelujejo tudi: zapletenejši vzorci aktivacije mišice, ločena aktivacija različnih motoričnih enot po različnih vzorcih in sproščanje posebnih kemičnih mediatorjev iz živca. S kombinirano uporabo več teh dejavnikov bi lahko v prihodnjih poskusih bolj uspešno preprečili podnervacijske spremembe v podganji hitri mišici.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema najinemu mentorju doc. dr. Samu Ribariču. V dveh letih skupnega dela naju je sistematično seznanil in uvedel v znanstvenoraziskovalno delo na vseh ravneh. Od začetkov poskusov z učenjem kirurških tehnik, njihovega načrtovanja, vrednotenja dobljenih rezultatov, pa do samega pisanja znanstvenega besedila, nama je vedno stal ob strani s svojimi idejami in kritičnimi pripombami. Še enkrat iskrena hvala.

Iskrena hvala prof. dr. Janezu Sketlju za vse nasvete v zvezi z raziskovalno nalogo. Bili so nadvse koristni, ko sva jih najbolj potrebovala.

Hvala mag. dr. Petru Preglju in gospodu Borisu Pečenku za izvedbo analize Northern-blot, gospe Vanji Mavrin za vso praktično pomoč v laboratoriju in dr. Janezu Rozmanu za izdelavo tehničnih pripomočkov potrebnih za električno draženje. Hvala gospodu Josipu Bjeliju, ki je skrbel, da sva vedno imela dovolj podgan za poskuse.

Hvala tudi vsem preostalim zaposlenim na Inštitutu za patološko fiziologijo za vso izkazano pomoč in prijaznost.

## LITERATURA

1. Rotundo RL, Fambrough DM. Function and molecular structure of acetylcholinesterase. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1994. pp. 607-23.
2. Sketelj J. Neural regulation of acetylcholinesterase in skeletal muscles. *BAM* 1994; 4: 281-91.
3. Brzin M, Sketelj J, Klinar B. Cholinesterases. In: Lejtha A, ed. *Handbook of neurochemistry*. New York: Plenum Press, 1983: 251-92.
4. Massoulie J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann Rev Neurosci* 1982; 5: 57-106.
5. Silver A. *The biology of cholinesterase*. Amsterdam: North Holland Publishing Comp., 1974.
6. Taylor P. The cholinesterases. *J Biol Chem* 1991; 266: 4025-28.
7. Toutant J-P, Massoulie J. Acetylcholinesterase. In: Kluney AJ, Turner AJ, eds. *Mammalian ectoenzymes*. Amsterdam: Elsevier, North Holland Publishers, 1987: 289-328.



8. Črne-Finderle N. Uravnavanje acetilholinesteraze in drugih sinaptičnih sestavin v skeletni mišici med regeneracijo [doktorska disertacija]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 1992.
9. Dale HH. The action of certain esters of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 1914; 6: 147-90.
10. Nachmansohn D. Cholinesterase dans le systeme nerveux central. *Bull Soc Chim Biol* 1939; 21: 761-96.
11. Bernsohn J, Barron KD, Hess AR. Multiple nature of acetylcholinesterase in nerve tissue. *Nature* 1962; 195: 285-6.
12. Jasmin BJ, Boudreau-Lariviere C, Adatia FA, Angus L, Chan RYY, Kotlarewski M, Krupa AM, Mankal FA. Molecular mechanisms controlling the synapse-specific expression and activity-linked regulation of acetylcholinesterase in skeletal muscle fibers. In: Doctor BP, Taylor P, Quinn DM, Rotundo RL, Gentry MK, eds. *Structure and function of cholinesterases and related proteins*. New York: Plenum Press, 1998. pp. 45-50.
13. Martin RG, Ames. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J Biol Chem* 1961; 236: 1372-9.
14. Massoulie J, Reiger F. L'acetylcholinesterase des organes elctriques de poisson (torpille et gymnote). *Eur J Biochem* 1969; 11: 441-55.
15. Massoulie J, Bon S, Vigny M. The polymorphism of cholinesterase in vertebrates. *Neurochem* 1980; 2: 161-84.
16. Massoulie J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann Rev Neurosci* 1982; 5: 57-106.
17. Sussman JL, Harel M, Frolow F et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991; 253: 872.
18. Shafferman A, Velan B, eds. *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*. New York: Plenum Press; 1992.
19. Lee SL, Heinemann S, Taylor P. Structural characterisation of the asimetric (17 + 13)S forms of acetylcholinesterase from *Torpedo*: I. Analysis of subunit composition. *J Biol Chem* 1982; 257: 12283.
20. Lee S, Taylor P. Structural characterisation of the asimetric (17 + 13)S species of acetylcholinesterase from *Torpedo*: II. Component peptides obtained by selective proteolysis and disulfide bond reduction. *J Biol Chem* 1982; 257: 12292.
21. Sketelj J. Motor nerve regulates different aspects of acetylcholinesterase metabolism in skeletal muscles. In: Eržen I, Pajer Z, eds. *Life sciences 1996. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference; 1996 Sept 21-26; Gozd Martuljek, Slovenija*. Ljubljana: Society for Stereology and Quantitative Image Analysis; 1996. pp. 145-8.
22. Gauthier GF. Skeletal muscle fiber types. In: Engel AG, Banker BQ, eds. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1986. pp. 255-83.
23. Pette D, Vrbova G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle & Nerve* 1985; 8: 676-89.
24. Zgonc V, Vodiškar J. Vpliv električnega draženja na presnovo acetilholinesteraze v skeletni mišici v razmerah glukokortikoidne miopatiije [Prešernova naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1998.
25. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116: 1-76.
26. Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 51-5.
27. Sketelj J, Črne-Finderle N, Štrukelj B, Trontelj JV, Pette D. Acetylcholinesterase mRNA level and synaptic activity in rat muscles depend on nerve-induced pattern of muscle activation. *J Neurosci* 1998; 18: 1944-52.
28. Groswald DE, Dettbarn W-D. Characterisation of acetylcholinesterase molecular forms in slow and fast muscle in rat. *Neurochem Res* 1983; 8: 983-95.
29. Sketelj J, Črne-Finderle N, Dolenc I. Factors influencing acetylcholinesterase regulation in slow and fast skeletal muscles. In: Shafferman A, Velan B, eds. *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*. New York: Plenum; 1992. pp. 209-16.
30. Sketelj J, Črne-Finderle N, Brzin M. Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extra-junctional acetylcholinesterase in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 1992; 21: 415-21.
31. Rotundo RL, Fambrough DM. Synthesis, transport, and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cultures. *Cell* 1980; 22: 583.
32. Tennyson VM, Brzin M, Kremzner LT. Acetylcholinesterase activity in the myotube and muscle satellite cell of the fetal rabbit: An electron microscopic-cytochemical and biochemical study. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 634.
33. Sawyer HR, Golder TK, Neiberg PS, Wilson BW. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in cultured cells: I. Embryo muscle. *J Histochem Cytochem* 1976; 24: 969.
34. Younkin SG, Rosenstein C, Collins PL, Rosenberry TL. Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J Biol Chem* 1982; 257: 13630.
35. Brzin M, Kiauta T. Cholinesterase of the motor end-plate of the rat diaphragm. *Progr Brain Res* 1979; 49: 313-22.
36. Brzin M, Pucihar S. Iodide, thiocyanate and cyanide ions as capturing reagents in one-step copperthiocholine method for cytochemical localization of cholinesterase activity. *Histochem* 1976; 48: 238-92.

37. Hall ZW, Kelly RB. Enzymatic detachment of end-plate acetylcholinesterase from muscle. *Nature New Biol* 1971; 232: 62–3.
38. McMahn UJ, Sanes JR, Marshall LM. Cholinesterase is associated with basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* 1978; 271: 172–4.
39. Sketelj J, Brzin M. Attachment of acetylcholinesterase to structures of the motor endplate. *Histochem* 1979; 6: 239–48.
40. 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.
41. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Pro Neurobiol* 1993; 41: 31–91.
42. Fernandez HL, Inestrosa NC, Stiles JR. Subcellular localisation of acetylcholinesterase molecular forms in endplate regions of adult mammalian skeletal muscle. *Neurochem Res* 1984; 9: 1211–30.
43. Sketelj J, Brzin M. Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscle. *J Neurosci Res* 1985; 14: 95–103.
44. Inestrosa NC, Parelman A. Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J Membr Biol* 1990; 118: 1–9.
45. Rossi SG, Rotundo RL. Transient interactions between collagen-tailed acetylcholinesterase and sulfated proteoglycans prior to immobilisation on the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1996; 271: 1979–87.
46. Rotundo RL, Rossi SG, Anglister L. Transplantation of quail collagen-tailed acetylcholinesterase molecules onto the frog neuromuscular synapse. *J Cell Biol* 1997; 136: 367–74.
47. Marnay A, Nachmansohn D. Choline esterase in voluntary muscle. *J Physiol (Lond)* 1938; 92: 37–47.
48. Eccles JC, Katz B, Kuffler SW. Effect of eserine on neuromuscular transmission. *J Neurophysiol* 1942; 5: 211–30.
49. Greenfield S. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *TINS* 1984; 7: 364.
50. Vigny M, Bon S, Massoulie J, Letierrier F. Active-site catalytic efficiency of acetylcholinesterase molecular forms in *Electrophorus*, *Torpedo*, rat, and chicken. *Eur J Biochem* 1978; 85: 317.
51. Getman DK, Eubanks JH, Camp S in sod. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 170.
52. Massoulie J, Bon S. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31.
53. Taylor P. The cholinesterases. *J Biol Chem* 1991; 266: 4025.
54. Taylor P. *Impact of recombinant DNA technology and protein structure determination on past and future studies of acetylcholinesterase*. New York, Plenum Press 1992.
55. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 13: 31–91.
56. Taylor P, Raditz Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1994; 34: 281–320.
57. Hammond P, Rao R, Koenigsberger C, Brimijoin S. Regional variation in expression of acetylcholinesterase mRNA in adult rat brain analyzed by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10933–37.
58. Legay C, Bon S, Vernier P, Coussen F, Massoulie J. Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a Torpedo collagenic subunit. *J Neurochem* 1993; 60: 337–46.
59. Chan RYY, Adatia FA, Krupa AM, Jasmin MJ. Increased expression of acetylcholinesterase T and R transcripts during hematopoietic differentiation is accompanied by parallel elevations in the levels of their respective molecular forms. *J Biol Chem* 1998; *In press*.
60. Legay C, Huchet M, Massoulie J, Changeux JP. Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. *Eur J Neurosci* 1995; 92: 10624–28.
61. Rotundo RL. Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Prots Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 479–83.
62. Rotundo RL, Fambrough DM. Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cells. *Cell* 1980; 22: 583–94.
63. Rotundo RL, Fambrough DM. Secretion of acetylcholinesterase: Relation to acetylcholin receptor metabolism. *Cell* 1980; 22: 598.
64. Rotundo RL, Bernard JJ, Lee RK, Rossi S. Compartmentalisation of acetylcholinesterase mRNA and protein expression in skeletal muscle in vitro and in vivo: Implications for regulation at the neuromuscular junction. In: Schafferman A, Velan B, eds. *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*. New York and London: Plenum Press; 1992. pp. 217–22.
65. Fuentes ME, Taylor P. Control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Neuron* 1993; 10: 679–87.
66. Casanueva OI, Garcia-Huidobro T, Campos EO, Aldunate R, Garrido J, Inestrosa NC. A major portion of synaptic basal lamina acetylcholinesterase is detached by high salt- and heparin-containing buffers from the rat diaphragm muscle and Torpedo electric organ. *J Biol Chem* 1998; 273: 4258–65.
67. Črešnar B, Črne-Findrl N, Breskvar K, Sketelj J. Neural regulation of muscle acetylcholinesterase is exerted on the level of its mRNA. *J Neurosci Res* 1994; 38: 294–99.

68. Michel RN, Vu CQ, Tetzlaff W, Jasmin BJ. Neural regulation of acetylcholinesterase mRNAs at mammalian neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 1994; 127: 1061–69.
69. Grubic Z, Komel R, Walker WF, Miranda AF. Myoblast fusion and innervation with rat motor nerve alter distribution of acetylcholinesterase and its mRNA in cultures of human muscle. *Neuron* 1995; 14: 317–27.
70. Duclert A, Changeux JP. Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev* 1995; 75: 339–68.
71. Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell/Neuron (Suppl)* 1993; 72/10: 99–121.
72. Sketelj J, Črne-Finderle N. Neural activation of muscles regulates muscle acetylcholinesterase expression. In: Doctor BP, Taylor P, Quin DM, Rotundo RL, Gentry MK, eds. *Structure and function of cholinesterases and related proteins*. New York: Plenum Press; 1998. pp. 93–7.
73. Bacou F, Vigneron P, Massoulié J. Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle. *Nature* 1982; 296: 661–4.
74. Sketelj J, Leisner E, Gohlsch B, Škorjanc D, Pette D. Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits. *J Neurosci* 1997; 47: 49–57.
75. Hubatsch DA, Jasmin BJ. Mechanical stimulation increases expression of acetylcholinesterase in cultured myotubes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997; 273: C2002–9.
76. Lomo T, Massoulié J, Vigny MJ. Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *Neurosci* 1985; 5: 1180–7.
77. Luo Z, Fuentes M-E, Taylor P. Regulation of acetylcholinesterase mRNA stability by calcium during differentiation from myoblasts to myotubes. *J Biol Chem* 1994; 269: 27216–23.
78. Sveistrup H, Chan RYY, Jasmin BJ. Chronic enhancement of neuromuscular activity increases acetylcholinesterase gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1995; 269: C856–62.
79. Boudreau-Larivière C, Sveistrup H, Parry DJ, Jasmin BJ. Ciliary neurotrophic factor: regulation of acetylcholinesterase in skeletal muscle and distribution of messenger RNA encoding its receptor in synaptic versus extrasynaptic compartments. *Neurosci* 1996; 73: 613–22.
80. Boudreau-Larivière C, Jasmin BJ. Calcitonin gene related peptide decreases expression of acetylcholinesterase in mammalian myotubes. *FEBS Letters* 1999; 444: 22–6.
81. Fernandez HL, Hodges-Savola CA. Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP. *J Appl Physiol* 1996; 80: 357–62.
82. DeChiara TM, Vasjada R, Poueyemirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Kato A, Yanacopoulos GD. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 1995; 83: 313–22.
83. Kasprzak H, Salpeter MM. Recovery of acetylcholinesterase at intact neuromuscular junctions after in vivo inactivation with diisopropylfluorophosphate. *J Neurosci* 1985; 5: 951.
84. Rotundo RL, Thomas K, Porter-Jordan K, Benson RJJ, Fernandez-Valle C, Fine RE. Intracellular transport, sorting, and turnover of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1989; 264: 3146–52.
85. Fernandez HL, Duell MJ, Festoff BW. Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *J Neurobiol* 1979; 5: 441–54.
86. Vigny M, Koenig J, Rieger F. The motor endplate specific form of acetylcholinesterase: appearance during embryogenesis and re-innervation of rat muscle. *Neurochem* 1976; 27: 1347–53.
87. Collins PL, Younkin SG. Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J Biol Chem* 1982; 257: 13638–44.
88. Fernandez HL, Duell MJ, Festoff BW. Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *J Neurobiol* 1979; 5: 441–54.
89. McLughlin J, Bosmann HB. Molecular species of acetylcholinesterase in denervated rat skeletal muscle. *Exp Neurol* 1976; 52: 263–71.
90. Senni MI, Biagioni S, Marini P, Scarsella G. Acetylcholinesterase activity and molecular forms during denervation and reinnervation in extensor digitorum longus muscle of the rat. *Neurochem Res* 1981; 6: 1285–92.
91. Vigny M, Koenig J, Rieger F. The motor endplate specific form of acetylcholinesterase: appearance during embryogenesis and reinnervation of rat muscle. *J Neurochem* 1976; 27: 1347–53.
92. 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 AChE in muscles. *J Neurochem* 1993; 61: 501–8.
93. 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.
94. Fernandez HL, Duell MJ. Protease inhibitors reduce effects of denervation on muscle endplate acetylcholinesterase. *J Neurochem* 1980; 35: 1166–71.
95. Sketelj J, Črne-Findele N, Brzin M. Influence of denervation on the molecular forms of junctional and extra-junctional AChE in fast and slow muscles of the rat. *Neurochem Int* 1992; 21: 415–21.

96. Decker MM, Berman HA. Denervation-induced alterations of acetylcholinesterase in denervated and non-denervated muscle. *Exp Neurol* 1990; 109: 247-55.
97. Gregory EJ, Hodges-Savola CA, Fernandez HL. Selective increase of tetrameric (G4) acetylcholinesterase activity in rat hindlimb skeletal muscle following short-term denervation. *J Neurochem* 1989; 53: 1411-8.
98. Eken T, Gundersen K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow red muscles. *J Physiol* 1988; 402: 651-69.
99. Hennig R, Lomo T. Firing pattern of motor units in normal rats. *Nature* 1985; 314: 164-6.
100. Gundersen K, Leberer E, Lomo T, Pette D, Staron RS. Fiber types, calcium sequestering-proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat. *J Physiol* 1988; 398: 177-89.
101. Dettbarn W-D, Groswald D, Gupta RC, Misulis KE. Use and disuse and the control acetylcholinesterase activity in fast and slow twitch muscle of rat. In: Changeux J-P, Hocho F, Maelicq A, Neumann E, eds. *Molecular basis of nerve activity*. Berlin: Walter de Gruyter; 1985. pp. 567-88.
102. Sketelj J, Črešnar B. Neural regulation of acetylcholinesterase expression in slow and fast muscles of the rat. Quinn DM, Balasubramanian AS, Doctor BP, Taylor P, eds. *Enzymes of the cholinesterase family* New York: Plenum, 1995. pp. 253-60.
103. Brzin M, Zajiček J. Quantitative determination of acetylcholinesterase activity in individual endplates of normal and denervated gastrocnemius muscle. *Nature* 1958; 181: 626.
104. Guth L, Albers RW, Brown WC. Quantitative changes in cholinesterase activity of denervated muscle fibers and sole plates. *Exp Neurol* 1964; 10: 236-50.
105. Kiauta T, Brzin M, Dettbarn W-D. Synthesis of neuromuscular cholinesterases in innervated and denervated rat diaphragm. *Exp Neurol* 1977; 56: 281-8.
106. Rozman J, Šovinec B, Trlep M, Zorko B. Multielectrode spiral cuff for ordered and reversed activation of nerve fibres. *J Biomed Eng* 1993; 15: 113-20.
107. Pregelj P. Uravnavanje acetilholinesteraze v podganji mišici soleus v različnih razmerah [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2000.
108. Sreter FA, Pinter K, Joles F, Mabuchi K. Fast to slow transformations of fast muscles in response to long-term phasic stimulation. *Exp Neurol* 1982; 75: 95-102.
109. Hudlicka O, Tyler KR, Srihari T, Heilig A, Pette D. The effect of different patterns of long-term stimulation on contractile properties and myosin light chains in rabbit fast muscles. *Pfluegers Archiv* 1982; 393: 164-70.
110. Eerbeek O, Kernell D, Verhey BA. Effects of fast and slow patterns of tonic long-term stimulation on contractile properties of fast muscle in the cat. *J Physiol* 1984; 352: 73-90.

Prispelo 10. 3. 2001