

Korelacija med tipom težke verige miozina in energetsko presnovo v mišičnem vlaknu podgane*

Correlation between myosin heavy chain isoforms and prevailing metabolic pathways in rat muscle fibres

Manca Tekavčič**

Deskriptorji
mišična vlakna – metabolizem
miozin

Descriptors:
muscle fiber – metabolism
myosin

Izvleček. V raziskavi smo skušali dokazati, da je določen tip težke verige miozina vezan na določen tip presnove in da je aktivnost sukcinatne dehidrogenaze in α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze v istih tipih vlaken v različnih mišicah lahko različna. V mišicah extensor digitorum longus, tibialis anterior in na diafragmi petih podgan seva Wistar smo na prečnih rezinah zamrznjenih mišic določili tip mišičnega vlakna (I, IIA, IIB) na osnovi aktivnosti miofibrilarne ATP-aze v alkalnem in kislem mediju. V istih vlaknih smo imunohistokemično določili prisotnost težkih verig miozina (MHC) tipa I, IIA, IIX in IIB ter histofotometrično določili aktivnost sukcinatne dehidrogenaze in na menadion vezane α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze. Na osnovi izmerjenih vrednosti smo vlakna razvrstili v oksidativna, oksidativno-glikolitična in glikolitična.

Ugotovili smo, da so MHC tipa I prisotne v vlaknih tipa I, v mišici extensor digitorum longus pa še v vlaknih tipa IIA; MHC IIA in IIB so prisotne tako v vlaknih tipa IIA kot v vlaknih tipa IIB v vseh mišicah. MHC IIX smo določili v vlaknih, ki so histokemično tipa I, IIA in IIB, čistih vlaken tipa IIX razen posameznih, nismo dokazali.

Največji odstotek oksidativnih vlaken je v diafragmi, največji odstotek glikolitičnih vlaken v mišici extensor digitorum longus in največji odstotek oksidativno-glikolitičnih vlaken je v zunanjem delu mišice tibialis anterior.

Vlakna, ki vsebujejo MHC I, IIA ali IIB imajo lahko vse tri tipe presnove, čeprav je odstotek oksidativnih, glikolitičnih in oksidativno-glikolitičnih vlaken v različnih mišicah lahko različen.

V vseh tipih vlaken diafragme je aktivnost sukcinatne dehidrogenaze višja kot v drugih mišicah. Na osnovi rezultatov sklepamo, da ni popolne korelacije med tipi težkih verig miozina in pre-

Abstract. In the present research we tried to prove, that specific myosin heavy chain is related to a prevalent metabolic type and that activities of succinate-dehydrogenase and a glycerophosphate dehydrogenase in the same fibre types can be different in different muscles. We defined the muscle fibre types (I, IIA and IIB) on transversal sections of frozen muscles according to their myofibrillar ATPase activity in alkaline and acidic media. We excised extensor digitorum longus, tibialis anterior and diaphragm muscles of five Wistar rats. In the same fibres we immunohistochemically demonstrated myosin heavy chains (MHC) I, IIA, IIB and IIX and histochemically and histophotometrically determined the activities of succinate-dehydrogenase and glycerophosphate dehydrogenase. On the basis of the measured values we differentiated fibres in oxydative, glycolytic and oxydative-glycolytic.

We found out, that MHC I are present in type I fibres (in extensor digitorum longus muscle also in type IIA fibres), MHC IIA and IIB are present in IIA fibres and also in IIB fibres in all muscles. We defined MHC IIX in fibres which are histochemically type I, IIA and IIB. Anyhow, we found no pure IIX fibres. The greatest percentage of oxydative fibres was found in diaphragm, of glycolytic in extensor digitorum longus and of oxydative-glycolytic in the outer portion of tibialis anterior muscle.

Fibres, containing MHC I, IIA or IIB belong to all three metabolic types, although the percentage of oxydative, glycolytic and oxydative-glycolytic fibres can be different in different muscles. Most fibre types present in diaphragm possess higher succinate-dehydrogenase activity than do the same fibre types in other muscles.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1995.

**Manca Tekavčič, štud. med., Inštitut za anatomijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

vladujočim tipom presnove v vlaknih. Morda obstajajo še kakšne, doslej nepoznane MHC, ki so vezane na bolj glikolitično presnovo in so prisotne v vlaknih skupaj z že poznanimi MHC ali pa je širok spekter presnovnih lastnosti tipov mišičnih vlaken posledica vpliva ravni ščitničnih hormonov in lokalnih dejavnikov, kot so prekrvlnost, vezivno tkivo, napetost in drugo.

We conclude, that there is no complete correlation between myosin heavy chains and the prevalent type of metabolism.

It is possible that some other MHC exist, which are connected to more glycolytic metabolic pathways and are present in fibres together with already known MHC. The wide spectrum of metabolic properties of muscle fibre types can also result from the level of thyroid hormones and local factors, such as capillary supply, connective tissue, tension and others.

Uvod

Funkcionalno ločimo dva osnovna tipa skeletnih mišičnih vlaken, počasna in hitra mišična vlakna.

Oba osnovna tipa lahko prikažemo s histokemično reakcijo na miofibrilarno adenosin-trifosfatazo (ATP-azo) s pomočjo kalcijeve metode pri pH 9,4 (1). Vlakna tipa I imajo nizko, vlakna tipa II pa visoko aktivno ATP-azo. Ker je hitrost kontrakcije premosorazmerna z aktivnostjo miofibrilarne ATP-aze (2), fiziološko ustrezajo vlakna tipa II hitro krčljivim, vlakna tipa I pa počasi krčljivim vlaknom. Obstajajo pa tudi intermediarna vlakna (med I in II po ATP-azni aktivnosti). Ali gre za IIA, IIB ali IIC vlakna (3), lahko ugotovimo šele po predinkubaciji v kislem mediju. V alkalnem mediju so vlakna tipa II pozitivna (ne izgubijo ATP-azne aktivnosti), po predinkubaciji v kislem mediju pa postopoma izgubijo svojo aktivnost. Najprej postanejo negativna vlakna tipa IIA, nato vlakna tipa IIB, vlakna tipa IIC pa ostanejo ves čas pozitivna. Vlakna tipa I so po kisli predinkubaciji ves čas pozitivna. Počasna vlakna (tip I) so torej acidostabilna, hitra vlakna (tip II) pa acidolabilna in zato alkalostabilna.

Včasih se v mišičnih vzorcih pojavljajo še vlakna vmesnih tipov, in sicer IC, ki so za razliko od vlaken tipa I v alkalnem mediju srednje aktivna, in vlakna IIAB, ki so za razliko od vlaken IIA in IIB srednje aktivna po predinkubaciji pri pH 4,6 ali 4,5 (tabela 1).

Tabela 1. Tipi skeletnih mišičnih vlaken, določeni na osnovi aktivnosti miofibrilarne ATP-aze po predinkubaciji v kislem oz. alkalnem mediju (3, 4). ••• – močna aktivnost (temna vlakna), •• – srednje močna aktivnost (srednje obarvana vlakna) in • – zelo šibka aktivnost (svetla vlakna).

Tip vlakna	pH 4,3	pH 4,5 ali pH 4,6	pH 9,4
I	•••	•••	•
IC	•••	•••	••
IIC	••	••	•••
IIA	•	•	•••
IIB	•	•••	•••
IIAB	•	••	•••

Večji del mišičnega vlakna izpolnjujejo miofibrile, v katerih po masi prevladujejo miozinski filamenti. Aktivni center miofibrilarne ATP-aze, to je encima, ki cepi ATP ob mišični

kontrakciji, je na težkih verigah miozina (MHC). V mišicah ekstremitet odraslih živali so dokazali en tip težkih verig počasnega miozina (MHC I ali β /slow) in tri tipe težkih verig hitrega miozina: MHC IIA, MHC IIB in MHC IIX (oz. MHC IID) (1, 5, 6). Dolgo je veljalo pravilo, da vsebuje vsako mišično vlakno normalne mišice le en tip miozina. Kadar sta v istem mišičnem vlaknu dva tipa miozina, je mišično vlakno v fazi pretvorb (7), ki so lahko posledica treninga, imobilizacije, električnega draženja ali spremenjene koncentracije hormonov ščitnice v mišici (4, 8). V novejšem času so dokazali, da sta v normalnem mišičnem vlaknu lahko prisotna hkrati tudi dva tipa težkih verig miozina, vendar so taka vlakna maloštevilna (7, 9–11).

Prisotnost težkih verig miozina v mišičnih vlaknih ugotavljamo imuno-histokemično z monoklonskimi protitelesi (5, 6, 12) (tabela 2).

Tabela 2. Uporabljena monoklonska protitelesa za prikaz težkih verig miozina (MHC). (+) – reakcija je pozitivna (vlakna se obarvajo temno) in (–) – reakcija je negativna (vlakna ostanejo svetla).

MHC	Monoklonska protitelesa				
	BA-D5	SC-71	BF-F3	RT-D9	BF-35
I	+	–	–	–	+
IIA	–	+	–	–	+
IIB	–	–	+	+	+
IIX	–	–	–	+	–

Vlakna lahko razdelimo tudi glede na prevladujoči tip presnove. Za ugotavljanje aerobne presnove merimo aktivnost sukcinatne dehidrogenaze (SDH) in NADH-dehidrogenaze (NADH-DH). Ugotovljeno je, da imajo počasi utrudljiva vlakna visoko aktivnost teh dveh encimov. Za ugotavljanje anaerobne presnove pa merimo aktivnost na menadion vezane α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze (GPDH). Visoka aktivnost tega encima je značilna za hitro utrudljiva vlakna (4).

Glede na to, od kod vlakna črpajo energijo za kontrakcijo, jih delimo na: oksidativna (O), če je vir oksidativna presnova, glikolitična (G), če so vir energije anaerobni procesi glikolize, in oksidativno-glikolitična (OG), če črpajo energijo za kontrakcijo iz obeh procesov (4).

Študija korelacije med tipi vlaken in aktivnostjo SDH je pokazala, da je aktivnost SDH najnižja v vlaknih tipa IIB, nekoliko višja v vlaknih tipa IIA, najvišja pa v vlaknih tipa I (13).

Znano je, da obstajajo določene povezave med tipi mišičnih vlaken in tipom prevladujoče energetske presnove v mišičnem vlaknu. Študije so pokazale, da se v poprečju obnašajo vlakna tipa IIB mnogo bolj glikolitično (aktivnost SDH je nizka) kot vlakna tipa IIA, ki so izraziteje oksidativna. Vlakna tipa I imajo povsod, razen v mišicah miši, najvišjo aktivnost SDH. Vlakna tipa IIB so zato hitra in hitro utrudljiva, vlakna tipa IIA so hitra in počasi utrudljiva, vlakna tipa I pa so počasna in počasi utrudljiva (13, 14).

Namen našega dela je bil, določiti histokemični tip vlaken na osnovi aktivnosti miofibrilarnih ATP-aze, primerjati tip vlakna s prisotnostjo težkih verig miozina v vlaknu, določiti

ti prevladujoči tip energetske presnove v istem vlaknu ter poiskati korelacije med vsemi tremi značilnostmi v treh podganjih mišicah z različno sestavo.

Postavili smo si naslednjo delovno hipotezo: med tipi težkih verig miozina in prevladujočim tipom oksidativne oziroma glikolitične presnove v mišičnem vlaknu obstaja določena korelacija. Vlakna istega tipa se lahko v različnih mišicah med seboj razlikujejo po aktivnosti SDH in GPDH.

Material in metode

Tkivni material

Vse reakcije smo izvedli na podganjih mišicah. Za pripravo vzorcev smo uporabili mišice petih 2–3 mesece starih podgan, seva Wistar, težkih 180–200 gramov. Izolirali smo mišice: extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) in diafragmo. Koščke tkiva smo shranili v tekočem dušiku (pri -195°C), pred uporabo pa v kriostatu (Reichert-Jung, 2800 Frigocut-N) pri -20°C . Narezali smo 10 μm debele rezine in jih shranili v hladilni skrinji pri -70°C . Nekaj ur pred poskusom smo rezine vzeli iz zamrzovalne skrinje in jih sušili pri sobni temperaturi. V vsaki mišici smo analizirali poprečno 81 vlaken. Da bi čim bolj poenotili pogoje dela in se izognili napakam, smo po tri mišice (EDL, TA in diafragmo) iste podgane rezali hkrati in rezine inkubirali na istem objektnem stekelcu.

Vzorke smo vzeli v predelu mišic, kjer so približno enako zastopani vsi tipi vlaken. Pri TA, ki je slojevit, smo vzorčili v zunanem predelu, ki je heterogen.

Histokemične reakcije

Histokemični prikaz aktivnosti miofibrilarne adenozintrifosfataze

Tipe mišičnih vlaken smo določili s kalcijevo metodo (1) pri pH 9,4 in po predinkubaciji v kislem mediju pri pH 4,6, 4,5 in 4,3 (15). Vlakna smo diferencirali v tipe I, IIA, IIB, IIC in IC (3, 16). Fiksirali smo le tiste rezine, ki smo jih inkubirali pri pH 9,4. Ostale reakcije smo delali na nefiksiranih rezinah. Fiksativ je vseboval 0,1 M kakodilatni pufer pH 7,2, 2 % paraformaldehid in 0,4 M saharozo. Fiksirali smo 5 minut pri 37°C . Nefiksirane tkivne rezine smo predhodno inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi (23°C) v mediju, ki je vseboval 0,2 M acetatni pufer pri treh vrednostih pH (4,3, 4,5, 4,6). Fiksirane in nefiksirane rezine smo nato predinkubirali 30 min pri 37°C v mediju, ki je vseboval 0,1 M CaCl_2 in 0,2 M Na-barbituratni pufer pri pH 9,4. Nato smo tkivne rezine potopili v kiveto z inkubacijskim medijem, ki je vseboval poleg 0,1 M CaCl_2 in 0,2 M Na-barbituratnega pufera pH 9,4 še 2,5 mM ATP. Inkubirali smo 20–40 min pri 37°C , sprali pod tekočo vodo in potopili v 2 % kobaltov klorid za 1–2 min. Sledilo je ponovno spiranje pod tekočo vodo, nato pa smo tkivne rezine za 10 s potopili v 1 % amonijev sulfid. Po ponovnem spiranju in dehidraciji preko alkoholne vrste je sledilo vklapljanje v kanadski balzam.

Princip histokemične reakcije je naslednji: ATP-aza cepi ATP v ADP in monofosfat, ki se s kalcijevimi ioni iz medija veže v belo oborino kalcijevega fosfata, slednji se s kobaltovimi ioni pretvori v bel kobaltov fosfat, ta pa z amonijevim sulfidom v rjavočrn kobaltov sulfid.

Metode za prikaz aktivnosti encimov oksidativne in glikolitične presnove

Histokemični prikaz sukcinatne dehidrogenaze

Rezine smo za 30–45 minut pri 37 °C potopili v inkubacijski medij, ki je vseboval 0,1 M fosfatni pufer pH 7,6, 5 mM EDTA, 1 mM KCN, 0,2 mM fenazin metosulfat, 50 mM natrijev sukcinat in 1,5 mM nitro-blue tetrazolijevo sol (NBT). Sledilo je spiranje z destilirano vodo in vklapljanje v glicerol želatino.

Princip reakcije je naslednji: sukcinatna dehidrogenaza odvzame solem jantarjeve kisline redukcijske ekvivalente, ki se prenesejo na tetrazolijevo sol, ta pa se na ta način reducira v netopen formazan. Tako postanejo encimske aktivne strukture modre oz. rožnate (17).

Histokemični prikaz aktivnosti na menadion vezane α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze

Rezine smo potopili v inkubacijski medij, ki je vseboval 15 mM α -glicerol-fosfat, 0,4 mM menadion, raztopljen v acetonu, 0,1 mM MgCl₂, 5 mM NBT, raztopljen v dimetilformaldehidu in 7,5 % polivinil alkohol v 0,06 M fosfatnem pufru pH 7,5. Inkubirali smo 20–30 min pri 37 °C, sprali z destilirano vodo in prekrili z glicerol želatino. Aktivna mesta so se obarvala modrovijolično.

Princip reakcije je naslednji: α -glicerol-fosfatna dehidrogenaza prenese redukcijske ekvivalente z glicerol-fosfata na tetrazolijeve soli, ki se zato reducirajo v obarvane formazane (18).

Imunohistokemični prikaz težkih verig miozina s pomočjo posredne imunoperoksidazne metode

Na težke verige miozina se po principu ključ – ključavnica (antigen – protitelo) veže primarno protitelo. Nanj vežemo sekundarno protitelo, ki ima veliko vezalnih mest za peroksidazo, kar izkoriščamo v barvni reakciji.

Uporabili smo naslednja primarna protitelesa proti težkim verigam miozina, ki smo jih razredčevali z 0,5 % govejim serumom (tabela 3).

Tabela 3. Primarna protitelesa proti težkim verigam miozina, njihove razredčitve, temperatura in čas inkubacije ter prikaz posameznega tipa težke verige miozina (MHC).

Prim. protitelo	Prikaz tipa MHC	Čas in temperatura inkubacije	Razredčitve
BA-D5	MHC I vlakna so temna	40 minut pri 37 °C	1 : 6000
SC-71	MHC IIA vlakna so temna	40 minut pri 37 °C	1 : 4000
BF-35	MHC IIX vlakna ostanejo svetla	40 minut pri 37 °C	1 : 5000
RT-D9	MHC IIB in MHC IIX vlakna so temna	čez noč v hladilniku	1 : 100
BF-F3	MHC IIB vlakna so temna	čez noč v hladilniku	1 : 100

Primarna protitelesa so darilo prof. Schiaffina (Padova). Kot sekundarno protitelo smo uporabili s peroksidazo konjugirane kunčje imunoglobuline (Ig G), pridobljene proti mišjim (Dakopats). Protitelesa smo razredčili v razmerju 1 : 40 z 0,5 % govejim serumom.

Nato smo 10 minut centrifugirali pri 12000–13000 obratih (180 g). Raztopino sekundarnih protiteles smo nanесли na rezine in inkubirali 20 min pri 37 °C. Za dokaz peroksidaze smo uporabili raztopino 0,05 M TRIS pH 7,6, 8 mg diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB) v 10 ml 0,2 M acetatnega pufru pH 5,2 in 5 μ l 35 % H₂O₂. Rezine smo inkubirali v temi 10 minut. Nato smo jih spirali pod tekočo vodo, da smo ustavili reakcijo, jih dehidrirali prek alkoholne vrste in ksilola ter jih prekrili s kanadskim balzamom. Reaktivna mesta so se obarvala rumenorjavo.

Fotografiranje obarvanih rezin in analiza slik

Obarvane rezine smo fotografirali s fotomikroskopom znamke Opton pri povečavi 160-krat. Rezine, na katerih smo imunohistokemično prikazali prisotnost težkih verig miozina, smo fotografirali s faznim kontrastom. Na serijskih fotografijah rezin smo določili tip mišičnega vlakna in prisotnost težkih verig miozina ter izračunali odstotek vlaken različnih tipov. S fotografijami smo se orientirali v rezinah, na katerih smo v istih vlaknih denzitometrično merili aktivnost SDH in GPDH.

Denzitometrija

Meritve v končni točki

Za merjenje absorpcije smo uporabili programe, ki jih je razvil Marko Ambrož delno po Optonovih predlogah, nekaj pa po lastnih zamislih (19). Na serijskih rezinah smo merili aktivnost SDH in GPDH v istih vlaknih. Merili smo absorpcijo znotraj celega preseka vlaken in izračunali poprečno absorpcijo na μ m². Vse meritve smo naredili na mikroskopskem fotometru (OPTON, UMSP 30) pri valovni dolžini 585 nm z zaslonko premera 0,16 mm, s korakom 32 v x in y smeri pri povečavi objektiva 10-krat. Velikost enega koraka je 0,25 μ m.

Ločitev oksidativnih vlaken od oksidativno-glikolitičnih in glikolitičnih

Rezultate smo analizirali z v ta namen razvitimi računalniškimi programi na naslednji način. Dobljene vrednosti poprečne absorpcije smo na osnovi frekvenčne porazdelitve razvrstili v tri skupine: z visoko, srednjo in nizko aktivnostjo. Nato smo združevali grupe za oba encima, in sicer: vlakna, ki imajo visoko ali srednjo aktivnost SDH in hkrati nizko aktivnost GPDH, so oksidativna (O). Nasprotno so tista, ki imajo visoko ali srednjo aktivnost GPDH in nizko aktivnost SDH, glikolitična (G). Vlakna, ki imajo visoko ali srednjo aktivnost obeh encimov, so oksidativno-glikolitična (OG).

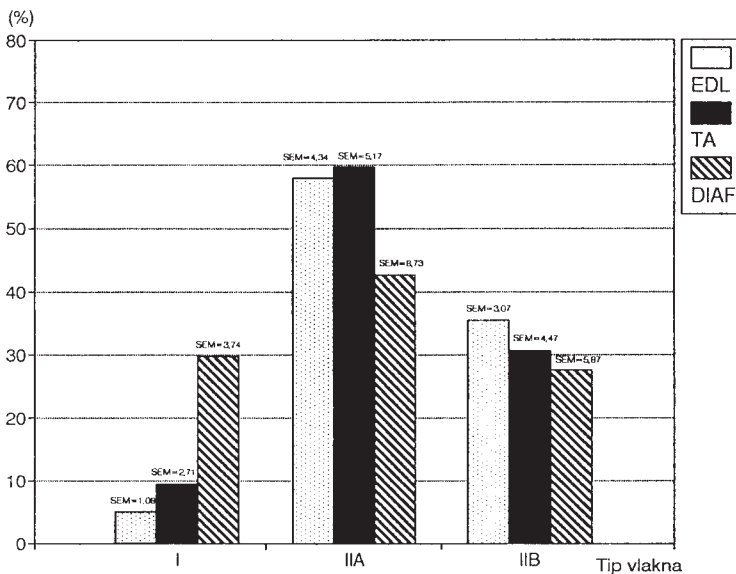
Statistična analiza

Za vse spremenljivke smo izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo in standardno napako poprečja. Srednje vrednosti smo testirali s Studentovim t-testom. V rezultatih navajamo stopnjo tveganja (P) le v tistih primerih, kjer so razlike statistično značilne. Če ni drugače navedeno, velja, da se po določeni lastnosti vse tri mišice (EDL, TA, diafragma) ne razlikujejo med seboj. Posamezne vrednosti absorpcije za vsako mišico smo izrazili v odstotkih razpona med minimalno in maksimalno vrednostjo absorpcije za določen encim v vsaki rezini.

Rezultati

Histokemični tip vlaken v mišicah tibialis anterior, extensor digitorum longus in diafragmi

Slika 1 prikazuje poprečni odstotek vlaken posameznega tipa (I, IIA in IIB) v mišicah (EDL, TA, diafragma). Pri računanju odstotka smo uporabili podatke vzorcev iz treh različnih mišic podgane. Rezultat je prikazan v odstotkih \pm standardna napaka poprečja (SEM). Dokazali smo vlakna tipov I, IIA in IIB. Vlaken tipa IIC nismo dokazali. Primer vlakna tipa IC smo našli le v TA in predstavlja $0,2\% \pm 0,2$ vseh vlaken v TA.



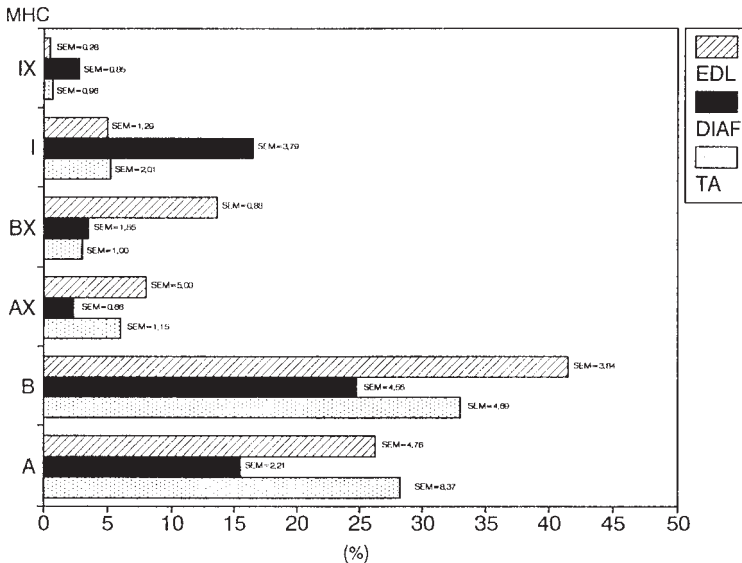
Slika 1. Delež tipov vlaken, določenih na osnovi aktivnosti ATP-az v mišicah: extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) in diafragmi (DIA).

V obeh hitrih mišicah (EDL in TA) prevladujejo vlakna tipa IIA, vlaken tipa IIB je največ v EDL in najmanj v diafragmi. Največ vlaken tipa I je v DIA ($P < 0,003$), kjer pa so prisotna tudi vlakna tipov IIA in IIB (vsak tip predstavlja približno 30%). Prehodnih vlaken IIB nismo mogli dokazati.

Prisotnost težkih verig miozina v mišicah tibialis anterior, extensor digitorum longus in diafragmi

Na sliki 2 je prikazan delež vlaken, ki vsebujejo določen tip težke verige miozina v mišicah TA, EDL in DIA. Največji delež vlaken, ki vsebujejo MHC IIB je v mišici EDL (40%), največji delež vlaken z MHC tipa I v diafragmi (15%), delež vlaken z MHC IIA pa je v diafragmi najnižji, v TA in EDL pa približno enak (25%). Skupno število vseh analiziranih

vlaknen v diafragmi je bilo 280, v TA 334 in v EDL 357. V diafragmi je delež vlaknen, ki vsebujejo kombinacijo MHC I in MHC IIX (na grafu označeno z IX), statistično značilno večji kot v drugih dveh mišicah ($P < 0,01$), drugi rezultati pa niso statistično značilni.



Slika 2. Delež vlaknen, ki vsebujejo določen tip težke verige miozina (MHC) v mišicah tibialis anterior (TA), diafragmi (DIA) in extensor digitorum longus (EDL).

Tabela 4 prikazuje odvisnost med tipi vlaknen, določenih na osnovi aktivnosti ATP-az in prisotnostjo tipov težkih verig miozina (MHC), ki so se pojavljale v posameznih mišicah (EDL, TA, diafragma). Rezultat je prikazan v odstotkih \pm srednja napaka meritve. V rezultatu je upoštevano poprečje štirih mišic vsakega tipa. Kot je razvidno iz tabele 4, smo ugotovili, da se vlakna, določena z ATP-azno aktivnostjo, ne ujemajo povsem s prisotnostjo tipa težke verige miozina. Najbolje so kompatibilna vlakna tipa I in MHC I, saj se ujemajo v poprečno 80 % v vseh mišicah. Značilno je, da so vlakna tipa IIB bolj kompatibilna z MHC IIB, kot vlakna tipa IIA z MHC IIA. Značilnosti veljajo za vse tri mišice. Zanimivo je, da vsebuje kar okrog 35 % vlaknen tipa IIA MHC IIB (velja za vse tri mišice) in le okrog 10 % vlaknen tipa IIB MHC IIA (tabela 4).

V tabeli 4 smo upoštevali le kombinacije težkih verig, ki so se pogosteje pojavljale. V TA so se pojavile tudi kombinacije: MHC IIA/IIB in MHC IIA/IIB/IIX, vendar le posamično. Prav tako so se le posamično pojavljale v DIA naslednje kombinacije: MHC I/IIA in MHC I/IIB.

Težke verige tipa I so razen v vlaknih, ki so histokemično tipa I, prisotne še v vlaknih tipa IIA v mišici EDL, vendar v zelo majhnem odstotku (0,5 %). Prisotnost težkih verig IIX smo z obstoječimi protitelesi lahko dokazali v vlaknih vseh histokemičnih tipov. Verige IIA in IIB so prisotne tako v vlaknih IIA kot tudi v vlaknih IIB v vseh mišicah.

Tabela 4. Primerjava med tipi mišičnih vlaken, določenih na osnovi aktivnosti miofibrilarne ATP-aze, in prisotnostjo težkih verig miozina v vlaknih mišic *extensor digitorum longus* (EDL), *tibialis anterior* (TA) in v diafragmi (DIA) (v odstotkih \pm SEM). * $P < 0,005$

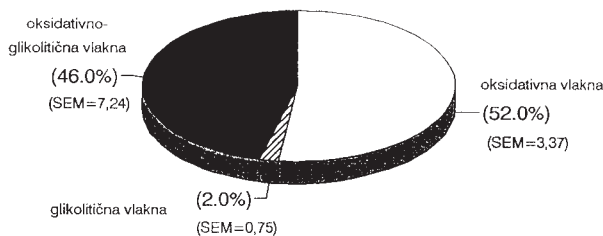
MHC	I			Tip vlakna IIA			IIB		
	EDL	TA	DIA	EDL	TA	DIA	EDL	TA	DIA
I	80 $\pm 7,06$ n = 19	79,5 $\pm 10,54$ n = 30	80 $\pm 5,34$ n = 69	0,5 n = 1	0	0	0	0	0
I+IIX	13,75 $\pm 8,25$ n = 2	16,25 $\pm 11,79$ n = 4	12 $\pm 5,34$ n = 9	0,5 n = 1	0	0	0	0	0
IIA	0	0	0	46,75 $\pm 7,87$ n = 98	53 $\pm 6,41$ n = 116	41,25 $\pm 13,76$ n = 49	5,75 $\pm 2,14$ n = 7	8,25 $\pm 4,25$ n = 6	18,75 $\pm 4,64$ n = 11
IIB	0	0	0	30 $\pm 2,68$ n = 63	31,7 $\pm 2,93$ n = 59	47 $\pm 15,64$ n = 56	86 $\pm 2,74$ n = 107	81,5 $\pm 7,54$ n = 76	78,5 $\pm 9,21$ n = 59
IIA+IIX	0	0	0	5,25 $\pm 3,54$ n = 12	11,3 $\pm 1,86^*$ n = 9	3,62 $\pm 1,43^*$ n = 5	1,25 n = 1	0	0
IIB+IIX	0	0	0	16,5 $\pm 5,68$ n = 35	3,7 $\pm 0,88$ n = 5	5,62 $\pm 3,86$ n = 6	7 $\pm 4,45$ n = 9	3,75 $\pm 3,75$ n = 2	8,75 $\pm 5,37$ n = 6

Prevladujoči tip presnove in aktivnosti encimov sukcinatne dehidrogenaze in α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze v mišicah tibialis anterior, extensor digitorum longus in diafragmi

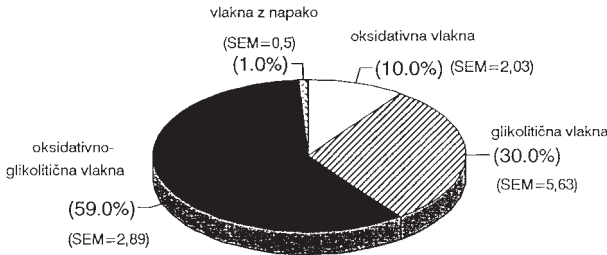
Slika 3, slika 4 in slika 5 prikazujejo strukturo mišic glede na tip prevladujoče energetske presnove v mišicah EDL, TA in diafragmi. Rezultati so prikazani v odstotkih \pm SEM.

Skupno število vseh vlaken, ki smo jih upoštevali pri statistični obdelavi, je bilo v diafragmi 280, v mišici TA 334, v mišici EDL pa 357.

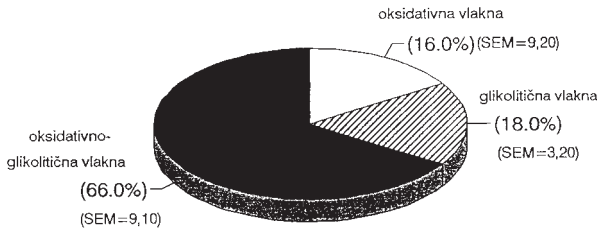
V EDL so se pojavljala posamezna vlakna, v katerih je bila aktivnost GPDH in SDH nizka. Taka vlakna predstavljajo na sliki 4 vlakna z napako.



Slika 3. Delež oksidativnih, glikolitičnih in oksidativno-glikolitičnih vlaken v diafragmi.



Slika 4. Delež oksidativnih, glikolitičnih in oksidativno-glikolitičnih vlaken v mišici *extensor digitorum longus*.



Slika 5. Delež oksidativnih, glikolitičnih in oksidativno-glikolitičnih vlaken v mišici *tibialis anterior*.

Za diafragmo je značilen velik delež oksidativnih vlaken (52 %, $P < 0,02$), delež oksidativno-glikolitičnih vlaken je v vseh mišicah sorazmerno velik (od 46 % v diafragmi do 66 % v mišici TA). Delež glikolitičnih vlaken je največji v EDL in zelo majhen, vendar še dokazljiv (2 %) v diafragmi, razlike med mišicami so statistično značilne ($P < 0,03$).

Tabela 5, tabela 6 in tabela 7 prikazujejo korelacijo med tipom težke verige miozina in prevladujočim tipom presnove (O, OG ali G). Rezultati so prikazani v odstotkih \pm srednja napaka meritve. V rezultatih je upoštevano poprečje štirih mišic vsakega tipa.

Tabela 5. Korelacija med presnovnim tipom vlakna in miozinsko težko verigo (MHC) za *extensor digitorum longus* (EDL) (poprečni odstotek \pm SEM). O – oksidativni, OG – oksidativno-glikolitični, G – glikolitični tip vlakna.

MHC	Presnovni tip vlakna		
	O	OG	G
I	50,00 \pm 11,06; n = 10	35,00 \pm 12,00; n = 7	15,00 \pm 6,24; n = 3
I+IIX	50,00; n = 1	50,00; n = 1	0
IIA	10,78 \pm 3,90; n = 11	70,50 \pm 7,24; n = 76	18,62 \pm 7,90; n = 18
IIB	6,00 \pm 3,76; n = 8	44,00 \pm 8,19; n = 72	50,00 \pm 10,40; n = 88
IIA+IIX	6,25; n = 1	81,25 \pm 21,69; n = 13	12,50 \pm 11,00; n = 2
IIB+IIX	2,77; n = 1	66,66 \pm 29,18; n = 24	30,55 \pm 14,18; n = 11

Tabela 6. Korelacija med presnovnim tipom vlaken in miozinsko težko verigo (MHC) za tibialis anterior (TA) (poprečni odstotek \pm SEM).

MHC	Presnovni tip vlakna		
	O	OG	G
I	7,25 \pm 4,75; n = 2	89,50 \pm 7,49; n = 17	13,25 \pm 8,1; n = 4
I+IIX	0	60,00 \pm 28,87; n = 3	40,00 \pm 40,00; n = 2
IIA	0,81; n = 1	78,7 \pm 4,70; n = 89	20,49 \pm 5,10; n = 23
IIB	2,50 \pm 1,44; n = 4	81,25 \pm 6,93; n = 104	16,00 \pm 11,58; n = 24
IIA+IIX	0	94,44 \pm 24,11; n = 17	3,55 \pm 3,55; n = 1
IIB+IIX	0	81,81 \pm 45,67; n = 9	18,18 \pm 15,13; n = 2

Tabela 7. Korelacija med presnovnim tipom vlaken in miozinsko težko verigo (MHC) za diafragmo (DIA) (poprečni odstotek \pm SEM).

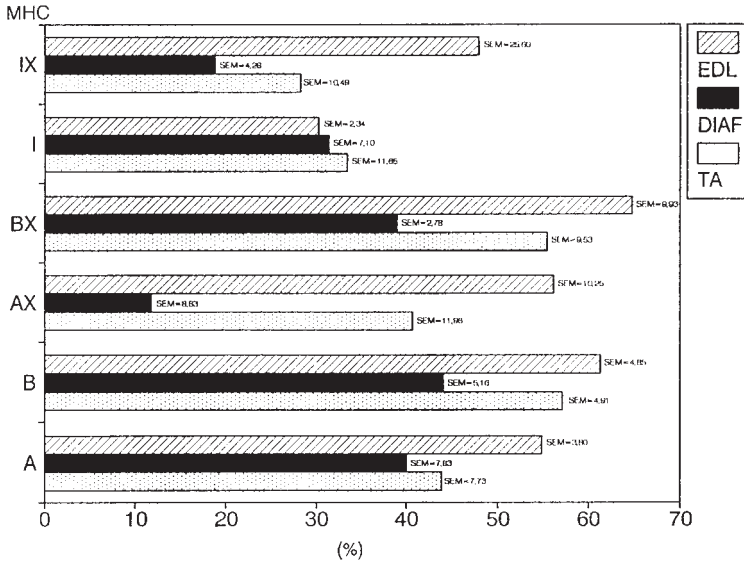
MHC	Presnovni tip vlakna		
	O	OG	G
I	59,09 \pm 7,09; n = 39	37,87 \pm 10,58; n = 25	3,03 \pm 2,36; n = 2
I+IIX	91,75 \pm 8,25; n = 10	8,25; n = 1	0
IIA	53,12 \pm 9,86; n = 34	42,00 \pm 10,08; n = 27	1,61; n = 1
IIB	47,75 \pm 5,73; n = 45	49,00 \pm 7,91; n = 52	3,25 \pm 2,36; n = 2
IIA+IIX	66,66 \pm 25,02; n = 4	33,33 \pm 23,75; n = 2	0
IIB+IIX	30,12 \pm 10,67; n = 5	69,80 \pm 0,66; n = 9	0

Vse težke verige miozina so lahko prisotne v vlaknih vseh presnovnih tipov. Največji delež vlaken, ki vsebujejo verigo I, je oksidativen (v EDL in diafragmi) oz. oksidativno-glikolitičen (v TA). Največji delež vlaken, ki vsebujejo verigo IIA, je oksidativno-glikolitičen (v EDL in TA), v diafragmi pa oksidativen. Vlakna, ki vsebujejo verigo IIB, so v EDL pretežno glikolitična (velik delež je oksidativno-glikolitičnih). V mišici TA je glavnina vlaken, ki vsebujejo verigo IIB, oksidativno-glikolitičnih. V diafragmi pa je približno enak delež vlaken, ki vsebujejo verigo IIB, oksidativno-glikolitičen in oksidativen.

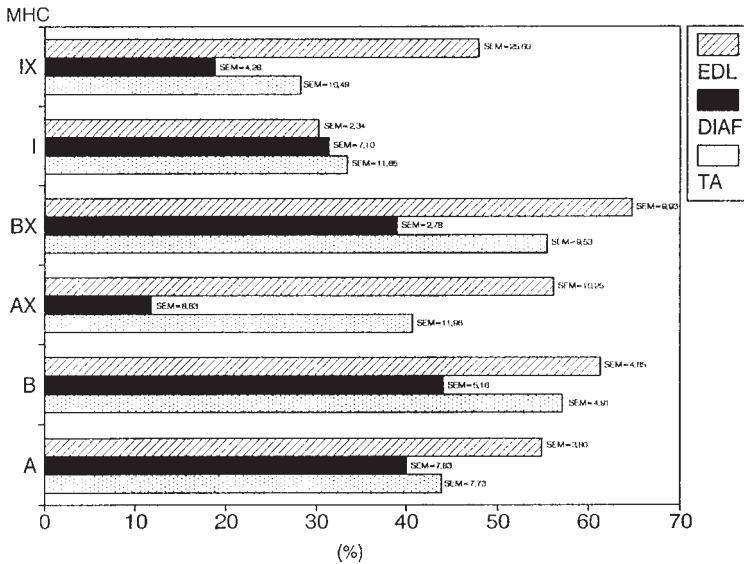
Slika 6 prikazuje korelacijo med tipi težkih verig miozina (MHC) in aktivnostjo GPDH za posamezno mišico. Upoštevali smo le kombinacije težkih verig, ki so se pogosteje pojavljale. V TA so se pojavile tudi kombinacije: MHC IIA/IIB in MHC IIA/IIB/IIX, vendar le posamično. Prav tako so se le posamično pojavljale v diafragmi naslednje kombinacije: MHC I/IIA, MHC I/IIB.

Slika 7 prikazuje razmerje med relativnima aktivnostima obeh encimov, ki smo ju uporabili za dokaz prevladujočega tipa energetske presnove (SDH in GPDH). Razmerje SDH/GPDH smo primerjali samo v vlaknih mišic EDL in diafragme, ker smatramo, da smo pri teh mišicah analizirali reprezentativni vzorec za cele mišice. Analizirani vzorci TA so bili vzeti iz perifernega dela, ki predstavlja približno 20 % preseka celotne mišice, zato ta del za mišico TA ni reprezentativen.

Razmerje SDH/GPDH je v večini vlaken v diafragmi višje kot v EDL.



Slika 6. Relativna aktivnost GPDH v vlaknih, ki vsebujejo različne tipe težkih verig miozina (MHC) v mišicah tibialis anterior (TA), extensor digitorum longus (EDL) in diafragmi (DIA) (v odstotkih razpona med minimalno in maksimalno vrednostjo absorpcije za vsak vzorec). V diafragmi imajo vlakna, ki vsebujejo verigi IIA in IIX, statistično značilno nižjo aktivnost GPDH ($P < 0,005$) kot enaka vlakna v drugih mišicah, sicer ni značilnih razlik.



Slika 7. Relativno razmerje SDH/GPDH v mišicah extensor digitorum longus (EDL) in diafragmi (DIA).

Razpravljanje

Prednosti in pomanjkljivosti uporabljenih metod

Histokemija

Histokemična diferenciacija tipov vlaken na osnovi miofibrilarne adenozin-trifosfataze omogoča zanesljivo ločitev le med vlakni tipa I, IIA, IIB in IIC. Vlaken tipa IIX (IID) ni mogoče določiti. Prav tako ni mogoče zanesljivo določiti prehodnih tipov vlaken, npr. IIAB. Aktivnost ATP-aze je odvisna od tipa težkih in lahkih verig miozina (4). Natančnejši vpogled v zgradbo mišice gotovo dobimo z določitvijo prisotnosti težkih verig miozina v mišičnih vlaknih. Protitelo BF-35 (5) ne reagira z vlakni, ki vsebujejo MHC IIX, torej je vlakna z MHC IIX ostanejo svetla (negativni prikaz). Značilno je, da razen posameznih vlaken nismo našli večjega deleža vlaken, ki bi vsebovala le MHC IIX. MHC IIX se je praviloma pojavljala v kombinaciji z IIA, IIB in I, kar kaže na nespecifičnost protitelesa BF-35 ali pa na pojavnost kakšne nove težke verige miozina, proti kateri nimamo protiteles.

Še natančnejše rezultate bi gotovo dobili, če bi dodatno uporabili metodo hibridizacije *in situ* in s tem dokazali še tip mRNA v posameznem vlaknu. Druga možnost bi bila uporaba drugih protiteles, ki bi se specifično vezala na težke verige IIX in tako dala pozitivno reakcijo, vendar pa nam taka protitelesa niso bila na voljo.

Histofotometrija

Histofotometrija omogoča objektivno ločevanje med različno aktivnimi vlakni. Uporabljali smo metodo meritev v končni točki, ki omogoča, da lahko na serijskih rezinah primerjamo aktivnost različnih encimov v istih mišičnih vlaknih. Histofotometrija je uporabna predvsem tam, kjer obstaja spekter aktivnosti encimov in se subjektivno težko odločimo, kje je meja med šibko, srednje in močno aktivnimi vlakni. Hkrati pa je ta metoda tudi zelo zahtevna, saj moramo rezine skrbno pripraviti, da se izognemo morebitnim artefaktom, ki lahko močno zmanjšajo specifičnost metode. Zavedati se moramo, da so tako dobljeni rezultati le relativni, saj nimamo primernih bioloških standardov. Prav tako so med različnimi rezinami možne le relativne primerjave, saj je za vrednotenje encimske reakcije pomembna debelina rezine, čas inkubacije in temperatura.

Koekspresija težkih verig miozina v istem mišičnem vlaknu

Starejše študije trdijo, da vsako vlakno lahko vsebuje le po en tip MHC, če pa sta prisotna dva tipa MHC ali celo več, gre za transformacijske procese, ki so posledica električnega draženja, treninga ali spremenjene koncentracije ščitničnih hormonov (4). Pretvorbe tipov težkih verig miozina in s tem tipov vlaken potekajo vedno v naslednjem zaporedju:



V istem vlaknu sta lahko torej prisotni le sosednji težki verigi iz navedene sheme (16, 20).

Novejše študije kažejo, da je možna prisotnost dveh ali celo več tipov težkih verig miozina v istem vlaknu (7, 9–11). Kombinacije, ki so jih našli, so bile: I/IIA, IIA/IIX, IIB/IIX.

Niso pa našli kombinacij IIA/IIB in I/IIX, ki so se pojavljale v naši raziskavi. IIA/IIB kombinacije so se pojavljale le v posameznih primerih, I/IIX pa v nekaj odstotkih. V enem vlaknu smo našli celo kombinacijo treh MHC (IIA/IIB/IIX).

Kombinacija težkih verig miozina MHC I/IIX je bila doslej neznana. Vzrok takih rezultatov je lahko tudi nespecifičnost protitelesa BF-35. V vlaknih s kombinacijo MHC IIA in IIB je možno, da gre za koekspresijo treh težkih verig miozina IIA, IIB in IIX, vendar pa MHC IIX ne moremo dokazati, ker je dokaz z BF-35 negativen.

Delež vlaken, ki vsebujejo kombinacije težkih verig miozina, je relativno majhen, vendar vseeno predstavlja v vsaki mišici poprečno okrog 7 %.

Primerjava med tipi vlaken, prisotnostjo težke verige miozina v vlaknu in prevladujočo presnovo

Raziskave kompatibilnosti tipov vlaken in njihove energetske presnove so se začele že v petdesetih letih. Leta 1972 je Peter s sodelavci ugotovil, da so vlakna tipa I predvsem oksidativna, vlakna tipa IIB predvsem glikolitična, vlakna tipa IIA pa v glavnem oksidativno glikolitična. Raziskava je bila opravljena na skeletnih mišicah (soleus in vastus lateralis) morskih prašičkov in kuncev (21).

Kasneje je bila opravljena študija aktivnosti SDH pri različnih tipih mišičnih vlaken sesalcev. Ugotovljeno je bilo, da je najožji spekter aktivnosti značilen za vlakna IIB, nekoliko širši za vlakna IIA, najširši pa za vlakna I. Rezultati dokazujejo, da je visoka aktivnost SDH značilna za oksidativna vlakna (13). Študija je bila opravljena le za encim SDH, ki je encim oksidativne presnove, ne pa tudi za GPDH, ki je encim glikolitične presnove. Prav tako še ni bil prikazan količnik med SDH in GPDH. Ta nam kaže, da je ne glede na tip vlakna aktivnost SDH bistveno višja v diafragmi, ki je bolj oksidativna mišica, nekoliko nižja v TA, najnižja pa v EDL, ki je predvsem glikolitična mišica.

Odkrit je bil tudi nov podtip vlakna II, in sicer IIX (5, 6). Ta vlakna se histokemično obnašajo kot vlakna tipa IIB. Ločimo jih lahko šele na osnovi prevladujoče presnove, saj so vlakna tipa IIX bolj oksidativna, vlakna tipa IIB pa bolj glikolitična (22, 23).

V diafragmi, ki je bolj oksidativna mišica in se krči vztrajno, bi pričakovali več vlaken z MHC I. Naši rezultati pa kažejo, da je približno enako razmerje med vlakni z MHC I, IIA in IIB (30 %). Tako velik delež vlaken tipa IIB bi lahko razlagali z možno koekspresijo s težko verigo IIX, česar pa ne moremo dokazati.

Doslej je bilo dokazanih največ vlaken z MHC IIX v diafragmi (od tod tudi drugo ime: MHC IID) (24). V naši raziskavi pa čistih vlaken (razen posameznih izjem) z razpoložljivimi protitelesi nismo našli.

Za vlakna z MHC IIX je značilna oksidativna presnova, vendar pa kombinacije težkih verig miozina, v katerih nastopa tudi MHC IIX, niso zgolj oksidativne, ampak pomembno prispeva tudi druga komponenta (npr. vlakna, ki vsebujejo kombinacijo MHC IIX/IIB, so bolj glikolitična, vlakna z MHC IIX/IIA pa bolj oksidativno-glikolitična). Tip energetske presnove pa je različen tudi glede na tip mišice. Najbolj glikolitično se obnaša EDL. Pri TA moramo upoštevati, da je analiziran le periferni del, zato rezultatov ne moremo

posplošiti na celo mišico, ki bi se kot celota zanesljivo obnašala bolj glikolitično. Primerjava tipa težke verige miozina in vrste prevladujoče presnove v posameznem vlaknu v diafragmi kaže, da so vlakna z vsemi tipi težkih verig miozina v največjem deležu oksidativna, razen vlakna z MHC IIA in MHC IIB/IIX, ki so pretežno oksidativno-glikolitična. Glikolitična vlakna se v diafragmi pojavljajo le posamično. To nam dokazuje, da je diafragma mišica, ki za vir energije uporablja predvsem oksidativne procese.

Za TA je značilen največji delež oksidativno-glikolitičnih vlaken (značilno za vse tipe MHC). Redka so oksidativna vlakna, relativno velik delež je glikolitičnih (3–25%).

Za EDL je značilno veliko število oksidativnih vlaken z MHC I in velik delež glikolitičnih vlaken z MHC IIB, v večini vlaken pa prevladuje oksidativno-glikolitičen tip presnove.

Iz rezultatov za vse mišice pa je razvidno, da so vlakna z MHC IIB, ki veljajo za močno glikolitična, kar precej oksidativna.

Za počasna vlakna tipa I je veljalo, da so le oksidativna, glede na naše rezultate pa lahko sklepamo, da so lahko vseh presnovnih tipov.

Iz rezultatov je razvidno, da so tudi vlakna tipa I lahko oksidativno-glikolitična (25) in glikolitična, kar lahko primerjamo tudi s humanimi mišicami (26).

Dejavniki, ki določajo tip mišičnega vlakna

Skeletna mišična vlakna se diferencirajo v hitra in počasna vlakna pod vplivom motoričnega živca. Vlakna iste motorične enote so histokemično istega tipa (27). Raziskave dokazujejo, da imajo lahko vlakna istega tipa, določenega na osnovi aktivnosti miofibrilarne ATP-aze, lahko precej različno aktivnost sukcinatne dehidrogenaze in α -glicerol-fosfatne dehidrogenaze (28, 29). Iz rezultatov naše raziskave je razvidno, da imajo vlakna, ki vsebujejo različne težke verige miozina, lahko oksidativno, oksidativno-glikolitično in glikolitično presnovo. Glavnina vlaken sicer večinoma pripada le enemu presnovnemu tipu. Sklepamo, da tip vlakna sicer res določa motorični živec, ki oživčuje mišico, raven ščitničnih hormonov in lokalni dejavniki kot so prekrvljenost, vezivno tkivo in napetost, pa lahko osnovni tip vlakna nekoliko modificirajo. Ne izključujemo možnosti, da obstajajo še druge težke verige miozina, ki jih doslej še niso uspeli dokazati. Te verige so v mišičnem vlaknu lahko prisotne samostojno ali pa v kombinaciji z drugimi verigami. Morda so nekatere bolj vezane na glikolitično, druge pa bolj na oksidativno presnovo. Skeletna mišica je vsekakor heterogena po svoji sestavi. Zanj je značilna izredna plastičnost, ki ji omogoča, da se hitro prilagaja spremenjenim funkcionalnim zahtevam in/ali živčno-mišični aktivnosti. Ločevanje vlaken v rdeča in bela je lahko zmotno in ne daje osnovnih podatkov o delovanju mišice (4).

Sklepi

V mišicah EDL, TA in diafragmi podgane imajo vsi tipi vlaken (I, IIA, IIB) lahko vse tri tipe presnove (oksidativno, oksidativno-glikolitično in glikolitično). Nekatere kombinacije, kot npr. glikolitična vlakna tipa I v diafragmi, so sicer zelo redke, vendar tudi obstajajo.

Večina vlaken, ki vsebuje določen tip težke verige miozina, je v določeni mišici vezana na določen tip presnove. Tako so vlakna, ki vsebujejo MHC I v EDL in diafragmi predvsem oksidativna, v TA pa predvsem oksidativno-glikolitična. Vlakna, ki vsebujejo MHC IIA so v EDL in TA predvsem oksidativno-glikolitična, v diafragmi pa predvsem oksidativna. Vlakna z MHC IIB pa so v diafragmi in TA predvsem oksidativno-glikolitična, v EDL pa glikolitična. Kot kaže v vlaknih s koekspresijo MHC, igrajo pomembnejšo vlogo MHC IIB, IIA in I kot pa MHC IIX. Tako se vlakna z MHC IIB/IIX obnašajo podobno kot vlakna z MHC IIB, vlakna z MHC IIA/IIX podobno kot vlakna, ki vsebujejo le MHC IIA, in vlakna z MHC I/IIX podobno kot vlakna, ki vsebujejo le MHC I.

V diafragmi ima večina vlaken višjo aktivnost indikatorskih encimov oksidativne presnove kot v mišicah EDL in TA, čeprav so kljub temu lahko tudi oksidativno-glikolitična in glikolitična.

Neobičajna koekspresija težkih verig miozina tipa I in IIX, ki smo jo ugotovili pri precej visokem odstotku vlaken tipa I, kaže na nespecifičnost protitelesa BF-35 ali pa na prisotnost kakšne nove težke verige miozina, ki ne reagira s protitelesom IIX in doslej ni bila opisana.

Sklepamo, da je v skeletnih mišičnih vlaknih prisoten še kakšen drug, doslej neopisan tip težke verige miozina, ki je morda vezan na bolj glikolitično presnovo, ali pa je širok spekter presnovnih lastnosti tipov mišičnih vlaken posledica vpliva ravni tiroidnih hormonov in lokalnih dejavnikov, kot so prekrvljenost, vezivno tkivo, napetost in drugo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, dr. Idi Erženovi, za nasvete, kritične pripombe in vsestransko pomoč pri nastajanju te naloge. Zahvaljujem se tudi Ani Tomažinčič, ing. Slavku Obrezi, Milanu Števanecu, Cvetki Mehle in ing. Tatjani Kovač za tehnično izvedbo naloge. Zahvala velja tudi ostalim članom Inštituta za anatomijo.

Literatura

1. Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1955; 3: 170–83.
2. Bárányi M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967; 50: 197–218.
3. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch Neurol* 1970; 23: 369–79.
4. Pette D, Staron SR. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116: 1–76.
5. Schiaffino S, Saggin L, Viel A, Ausoni S, Sartore S, Gorza L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: Benzi G, Packer L, Siliprandi N, eds. *Biochemical Aspects of Physical Exercise*. Amsterdam: Elsevier, 1986: 27–34.
6. Gorza L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 257–65.
7. Staron SR, Pette D. The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem J* 1987; 243: 695–9.

8. Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 20: 115–202.
9. Danielli-Betto D, Zerbatto E, Betto R. Type I, IIA and IIB myosin heavy chains electrophoretic analysis of rat skeletal muscle fibres. *Biochem Biophys Res Comm* 1986; 138: 981–7.
10. Lutz H, Weber H, Billeter R, Jenny E. Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbit muscles. *Nature* 1979; 281: 142–4.
11. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 1989; 92: 453–7.
12. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Gundersen K, Lömo T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1989; 10: 197–205.
13. Reichman H, Pette D. A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I, IIA and IIB fibres of mammalian and human muscles. *Histochemistry* 1982; 74: 27–41.
14. Spurway NC. Interrelationship between myosin-based and metabolism-based classification of skeletal muscle fibers. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 87–90.
15. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969; 25: 138–52.
16. Staron SR, Pette D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 1993; 100: 149–53.
17. Reichman H, Pette D. Glycerolphosphate oxidase and succinate dehydrogenase activities in IIA and IIB fibres of mouse and rabbit tibialis anterior muscles. *Histochemistry* 1984; 80: 429–33.
18. Kugler P. Microphotometric determination of enzymes in brain sections. *Histochemistry* 1991; 95: 579–83.
19. Eržen I, Ambrož M. Uporaba mikrodensitometričnih metod na mikroskopskem fotometru UMSP 30, Firme OPTON. *Jugosl Stereol* 1990; 9: 25–38.
20. Staron SR, Golsch B, Pette D. Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch* 1987; 408: 444–50.
21. Peter BJ, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochem* 1972; 14: 2627–33.
22. Larsson L, Ansved T, Edström L, Gorza L, Schiaffino S. Effect of age on physiological, immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor units in the rat. *J Physiol* 1991; 443: 257–75.
23. Larsson L, Edström L, Lindgren B, Gorza L, Schiaffino S. MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol* 1991; 261: 93–101.
24. Bär A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1988; 235: 153–5.
25. Nemeth PM, Hofer HW, Pette D. Metabolic heterogeneity of muscle fibres classified by myosin ATPase. *Histochemistry* 1979; 63: 191–201.
26. Eržen I, Ambrož M. Human type I fibres can be glycolytic. International Workshop: Sarcomeric myosins: Structure, function and dysfunction. Venice 1994: 27.
27. Edström L, Kugelberg E. Histochemical composition, distribution of fibres and fatigability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1968; 31: 424–33.
28. Larsson L. Is the motor unit uniform? *Acta Physiol Scand* 1992; 144: 143–54.
29. Martin TP, Bodine-Fowler S, Roy RR, Eldred E, Edgerton VR. Metabolic and fiber size properties of cat tibialis anterior motor units. *Am J Physiol* 1988; 255: 43–50.