

STRESZCZENIE POPULARNONAUKOWE

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza

Projekt dotyczy jednostek ruchowych, najmniejszych czynnościowych elementów układu nerwowo-mięśniowego. Część neuronalną jednostki ruchowej tworzy motoneuron i jego akson, a część mięśniową - zespół włókien mięśniowych, unerwianych wyłącznie przez ten neuron. Badania będą prowadzone w dwóch seriach doświadczeń elektrofizjologicznych na szczurach szczepu Wistar: (1) badania cech skurczu na izolowanych funkcjonalnie (poprzez rozdzielanie korzeni brzusznych nerwów rdzeniowych) jednostkach ruchowych mięśnia brzuchatego łydki, który zawiera trzy podstawowe typy jednostek: S – wolne, FR – szybkie, odporne na zmęczenie i FF – szybkie, szybko męczące się; (2) badania elektrofizjologicznych własności błonowych motoneuronów rdzenia kręgowego w trakcie wewnątrzkomórkowej rejestracji potencjałów elektrycznych za pomocą mikroelektrod szklanych. Celem projektu jest określenie zmian cech skurczu włókien mięśniowych jednostek ruchowych oraz zmian błonowych parametrów elektrycznych samych motoneuronów w modelu przeciążenia badanego mięśnia - na skutek wyłączenia z udziału w pracy (poprzez przecięcie ścięgna) mięśni normalnie współdziałających w realizacji ruchów. Badania takie mają na celu poszerzyć wiedzę o adaptacyjnych zdolnościach motoneuronów i jednostek ruchowych w warunkach funkcjonalnego przeciążenia, które często występuje podczas intensywnej pracy (przetrenowanie u sportowców, złe warunki ergonomiczne), w procesie starzenia się organizmu, w zespole post-polio, w następstwie niektórych rodzajów uszkodzeń układu nerwowo-mięśniowego (częściowe odnerwienie, transfer ścięgien) oraz w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie zanikowe boczne (ALS). Wstępna faza badań polegać będzie na odcięciu grupy mięśni synergistycznych od przyczepów końcowych (ścięgna Achillesa), z wyjątkiem jednego mięśnia brzuchatego łydki, który w efekcie stanie się jedynym mięśniem goleni z grupy tylnej działającym na stopę. Badania w kolejnej fazie (po 5-12 tygodniach) obejmą procedury w ramach eksperymentów ostrych, prowadzonych w głębokiej narkozie. Badane cechy motoneuronów i jednostek ruchowych mięśnia poddanego funkcjonalnemu przeciążeniu będą porównywane do cech jednostek mięśni zwierząt zdrowych z grupy kontrolnej, nieoperowanej. Dwa planowane zadania badawcze mają na celu stworzenie spójnego obrazu zmian po kompensacyjnym przeciążeniu mięśnia: (1) we włóknach mięśniowych jednostek ruchowych mięśnia brzuchatego łydki; (2) w motoneuronach segmentów lędźwiowych rdzenia kręgowego, zarówno tych unerwiających mięsień przeciążony, jak i tych unerwiających synergistyczny mięsień odciążony (głowa boczna mięśnia brzuchatego łydki i mięsień płaszczkowaty, odcięte od przyczepu końcowego).

Pierwsza seria doświadczeń dotyczyć będzie wpływu przeciążenia na tkankę mięśniową. Badania na czynnościowo izolowanych jednostkach mają dać odpowiedzi na pytania, czy w następstwie adaptacji do zmienionych warunków pracy mięśnia przeciążonego zmieniają się proporcje jednostek ruchowych FF, FR i S w mięśniu (a więc czy pojawią się zmiany

transformacyjne włókien mięśniowych) i jak zmieniają się w następstwie długotrwałego przeciążenia cechy skurczu jednostek różnych typów, efektywność sumowania skurczów w skurcz tężcowy i mechanizmy regulacji siły skurczu. Wyniki przeprowadzonych pilotażowych eksperymentów sugerują zmiany masy przeciążonego mięśnia i wskazują niejednorodny kierunek zmian adaptacyjnych w poszczególnych typach jednostek. Druga seria doświadczeń ma na celu określenie funkcjonalnych zmian zachodzących w motoneuronach rdzenia kręgowego unerwiających mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki, pracujący w warunkach kilkutygodniowego przeciążenia oraz w motoneuronach unerwiających odciążony mięsień brzuchaty boczny łydki. W badaniach elektrofizjologicznych motoneuronów wykorzystuje się fakt, iż nie tylko zmiana aktywności motoneuronów wymusza zmianę w unerwianych przez nie włóknach mięśniowych, ale i występują wpływy odwrotne, mianowicie włókna mięśniowe mogą również modulować cechy unerwiających je motoneuronów. Badania mają odpowiedzieć na pytania, jak zmieniają się błonowe parametry elektrofizjologiczne motoneuronów oraz parametry rytmicznej aktywności motoneuronu w następstwie depolaryzacji (zależność częstotliwości wyładowań od natężenia prądu podanego środkomórkowo). Wyniki doświadczeń pilotażowych sugerują, że nastąpią zmiany adaptacyjne odzwierciedlające zwiększoną pobudliwość motoneuronów mięśnia przeciążonego, a przeciwnie zmiany będą obserwowane w motoneuronach unerwiających synergistyczny mięsień odciążony (głowa boczna mięśnia brzuchatego łydki). Dodatkowym pytaniem badawczym jest, czy potencjalne zmiany dotyczyć będą jednakowo motoneuronów szybkich i wolnych i czy zmiany w motoneuronach odzwierciedlać będą zmiany adaptacyjne obserwowane we włóknach mięśniowych jednostek ruchowych? Warto podkreślić, że w odróżnieniu do badań cech efektorów, jakim są włókna mięśniowe, badania motoneuronów w tym modelu są możliwe zarówno w odniesieniu do neuronów sterujących mięśniem przeciążonym (brzuchaty przyśrodkowy łydki), jak i neuronów unerwiających jego synergistę (brzuchaty boczny łydki), który został odcięty, a więc wyłączony z pracy. Porównanie wyników uzyskanych w obu rodzajach motoneuronów umożliwi skonstruowanie pełniejszego i bardziej złożonego obrazu zmian, co ułatwi interpretację przebiegu procesów adaptacyjnych wskutek funkcjonalnego przeciążenia.

## 2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka

Materiał badawczy stanowią będą dorosłe (6-miesięczne) szczury szczepu Wistar. Doświadczenia prowadzone będą w trzech etapach: pierwszy, to chirurgiczny zabieg wywołujący przeciążenie mięśnia brzuchatego łydki (przecięcie ścięgien synergistów, tj. bocznej głowy mięśnia brzuchatego łydki, mięśnia podeszwowego i płaszczkowatego; przecięte ścięgna wymienionych mięśni będą podwiązywane do powięzi mięśni uda), po którym zwierzęta przeżywają okres od kilku (5) do kilkunastu (12) tygodni, swobodnie poruszając się w swoich klatkach wyposażonych w kołowrotek do biegania i dodatkowo poddane zostaną poddane treningowi na bieżni mechanicznej w celu intensyfikacji zmian przeciążeniowych w mięśniu (i zarazem w celu zapobieżenia oszczędzania operowanej kończyny). W drugim i trzecim etapie, w ostrych doświadczeniach w głębokiej narkozie pentobarbitalowej (lub, w przypadku badań motoneuronów, w narkozie za pomocą ketaminy i ksylazyny) badane będą (a) cechy skurczów i potencjałów czynnościowych jednostek

ruchowych – rejestrowane metodą czynnościowej izolacji poprzez rozdzielanie wiązki aksonów korzeni brzusznych nerwów rdzeniowych na cienkie filamenty, poddawane stymulacji elektrycznej; (b) błonowe parametry elektrofizjologiczne motoneuronów - rejestrowane bezpośrednio z motoneuronów za pomocą napełnionych elektrolitem mikroelektrod szklanych wkłuwanych do rdzenia kręgowego.

Po zarejestrowaniu parametrów mechanicznych i elektrycznych jednostek ruchowych, badany mięsień zostanie pobrany do dalszej analizy (określenia masy, wykonania preparatów histochemicznych i badań zawartości izoform łańcuchów ciężkich miozyn). Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta zostaną uśmiercone przez przedawkowanie środka znieczulającego. Wnioskodawcy posiadają dostęp do odpowiedniej aparatury specjalistycznej oraz mają doświadczenie w wykonywaniu wyżej opisanych procedur.

### 3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństwa

Wyniki badań planowanych we wniosku wprowadzą nowe elementy do podstawowej wiedzy z dziedziny fizjologii i patofizjologii mięśni, neurofizjologii rdzenia kręgowego i kinezylogii. Umożliwią lepsze zrozumienie adaptacyjnych, plastycznych zmian zachodzących w układzie nerwowo-mięśniowym w wyniku ich przeciążenia przez spadek liczby współpracujących w realizacji zadań motorycznych jednostek ruchowych (włókien mięśniowych). Taka sytuacja ma miejsce podczas procesu starzenia się organizmu i wielu chorobach związanych z uszkodzeniami lub zmianami degeneracyjnymi układu nerwowo-mięśniowego. Dzięki przeprowadzonym badaniom możliwe będzie wyjaśnienie nieznanych i nieopisanych wcześniej mechanizmów elementarnych fizjologicznych zmian na poziomie komórkowym rdzenia kręgowego i na poziomie włókien mięśniowych jednostek ruchowych, wywołanych chronicznym przeciążeniem mięśni. W efekcie lepsze zrozumienie procesów zachodzących w badanych strukturach i komórkach pozwoli na weryfikację istniejących metod terapeutycznych i profilaktycznych - stosowanych w celu zapobiegania negatywnym następstwom przeciążenia mięśni i w celu wydłużenia i poprawy jakości życia osób starych. Można także oczekiwać, że konsekwentne wykazanie spójnych elementów i mechanizmów adaptacji na poziomie obu części jednostki ruchowej (neuronalnej i mięśniowej) wpłynie na opracowanie nowych, precyzyjniej ukierunkowanych i skuteczniejszych metod przydatnych w fizjoterapii. Podjęcie tego kierunku badań elektrofizjologicznych może mieć także znaczenie w dyskusji i praktycznym zastosowaniu uzyskanych wniosków w odniesieniu do optymalizacji obciążeń treningowych, zarówno u ludzi hiperaktywnych (np. sportowców), jak i hipoaktywnych rekonwalescentów.

### 4. Współpraca międzynarodowa

Projekt będzie realizowany w efekcie współdziałania dwóch grup badawczych, a połączenie możliwości, doświadczenia i wiedzy obu grup badawczych zapewnia osiągnięcie oryginalnych odkryć. Każdy z partnerów włączonych w realizację projektu ma swoją odrębną tożsamość naukową, a pełna realizacja obu zadań badawczych wymaga współpracy dwóch zespołów. Polskie laboratorium wnioskodawcy ma doświadczenie w prowadzeniu badań na

czynnościowo izolowanych jednostkach ruchowych. Kierownik projektu ma również wieloletnie doświadczenie dotyczące elektrofizjologii rdzenia kręgowego. Laboratorium kanadyjskie, kierowane przez prof. P. Gardinera, ma ogromne doświadczenie w badaniach wewnątrzkomórkowych motoneuronów u szczura *in vivo* - szczególnie warto podkreślić, że pokaźna część wysoko notowanego dorobku naukowego tego laboratorium dotyczy zmian adaptacyjnych w następstwie różnych form zmienionego poziomu aktywności fizycznej. Ponadto partner zagraniczny ma możliwości aparaturowe, którymi nie dysponuje macierzyste laboratorium strony polskiej, współpraca daje więc szansę zastosowania dodatkowych metod elektrofizjologicznych, przede wszystkim w pomiarach niektórych cech motoneuronów i w analizach zapisów wywołanej aktywności rytmicznej. Nowoczesne metody eksperymentalne i połączenie w obu zadaniach badań na poziomie neuronów rdzenia kręgowego i włókien mięśniowych jednostek ruchowych umożliwią osiągnięcie znaczącego postępu w dziedzinie neurofizjologii i patofizjologii mięśni. Należy podkreślić, że uzyskanie kompleksowych wyników planowanych badań (w zakresie analiz zmian adaptacyjnych na kilku poziomach) jest niemożliwe bez współpracy obu zespołów. Założenia metodyczne i cele projektu zostały omówione, a wstępne eksperymenty pilotażowe przeprowadzone podczas wzajemnych wizyt naukowych przedstawicieli obu zespołów w latach 2009-2011.