

Katarzyna Kryściak

**Zmiany cech jednostek motorycznych w przebiegu
stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) na
zwierzęcym modelu choroby**

Rozprawa doktorska
wykonana w Zakładzie Neurobiologii Akademii Wychowania Fizycznego
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Promotor
Prof. dr hab. Jan Celichowski

Poznań, 2011

“Let us keep looking, in spite of everything. Let us keep searching. It is indeed the best method of finding, and perhaps thanks to our efforts, the verdict we will give such a patient tomorrow will not be the same we must give this man today.”

Charcot (1889)

(Z Kiernan i wsp., 2011)

Serdecznie dziękuję:

*Promotorowi pracy, Panu Profesorowi Janowi Celichowskiemu,
za opiekę naukową, poświęcony czas oraz cenne uwagi i rady;*

*Współpracownikom z Zakładu Neurobiologii AWF w Poznaniu
za wielokierunkową pomoc, inspirujące dyskusje oraz
niepowtarzalną atmosferę pracy;*

*A także wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania
niniejszej rozprawy.*

Spis treści

Wykaz skrótów	7
Streszczenie	9
Abstract	13
1. Wstęp	16
1.1. Stwardnienie zanikowe boczne	16
1.1.1. Etiologia	21
1.1.2. Patogeneza	24
1.1.3. Modele choroby	33
1.1.3.1. Modele „in vitro”	34
1.1.3.2. Modele „in vivo”	35
1.2. Jednostki motoryczne (ruchowe)	40
1.2.1. Definicja i podział jednostek motorycznych	40
1.2.2. Cechy jednostek motorycznych	41
1.2.3. Regulacja siły skurczu jednostki motorycznej	46
1.2.4. Potencjał czynnościowy jednostki motorycznej	47
1.3. Mechanizm reinerwacji obocznej	49
1.4. Plastyczność jednostek motorycznych	50
2. Cel pracy	55
3. Materiał i metody	57
3.1. Materiał badawczy	57
3.1.1. Obserwacja stanu zwierząt transgenicznych i podział na grupy badawcze	58
3.2. Anestezja i zabiegi chirurgiczne	58

3.3. Czynnościowa izolacja jednostki motorycznej	60
3.4. Wzorce stymulacji	60
3.5. Badane parametry skurczu jednostek motorycznych	62
3.6. Badane parametry potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych	65
3.7. Analiza statystyczna	66
4. Wyniki	67
4.1. Zmiany masy ciała i rozwój atrofii badanego mięśnia	67
4.2. Liczba jednostek motorycznych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki w końcowym stadium choroby	67
4.3. Klasyfikacja i proporcje jednostek motorycznych	69
4.4. Cechy skurczu jednostek motorycznych	72
4.4.1. Czas skurczu i połowicznego rozkurczu	76
4.4.2. Objaw ugięcia	80
4.4.3. Siła skurczu pojedynczego i tężcowego	81
4.4.4. Potężcowe wzmocnienie siły skurczu	85
4.4.5. Stosunek sił skurczu pojedynczego do tężcowego	87
4.4.6. Odporność na zmęczenie	87
4.5. Zmiany zależności siły skurczu od częstotliwości drażnienia	89
4.6. Cechy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych	96
4.6.1. Latencja potencjałów czynnościowych	100
4.6.2. Amplituda potencjałów czynnościowych	101
4.6.3. Czas trwania potencjałów czynnościowych	102
4.6.4. Czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału czynnościowego	102

4.6.5. Liczba faz i zwrotów potencjałów czynnościowych	104
5. Dyskusja	106
5.1. Zmiany masy ciała i rozwój atrofii badanego mięśnia	106
5.2. Proporcje jednostek motorycznych	108
5.3. Cechy skurczu jednostek motorycznych	111
5.3.1. Parametry czasowe skurczu	111
5.3.2. Zmiany zależności siły skurczu od częstotliwości drażnienia	112
5.3.3. Siła skurczu pojedynczego i tężcowego	115
5.3.4. Objaw ugięcia	117
5.3.5. Odporność na zmęczenie	118
5.4. Cechy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych	120
5.4.1. Latencja potencjałów czynnościowych	120
5.4.2. Amplituda potencjałów czynnościowych	121
5.4.3. Czas trwania potencjałów czynnościowych i czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału	122
5.4.4. Liczba faz i zwrotów potencjałów czynnościowych	122
5.5. Znaczenie funkcjonalne wyników badań	123
5.6. Podsumowanie dyskusji	124
6. Wnioski	127
7. Piśmiennictwo	130

Wykaz skrótów

ALS	(ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>) – stwardnienie zanikowe boczne
Bcl-2	białko zapobiegające apoptozie poprzez hamowanie uwalniania cytochromu c i czynnika indukującego apoptozę
BDNF	(ang. <i>brain derived neurotrophic factor</i>) – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego
CCS	(ang. <i>copper chaperone for SOD</i>) – wewnątrzkomórkowy chaperon dostarczający miedź do dysmutazy ponadtlenkowej typu 1
CT	(ang. <i>contraction time</i>) – czas skurczu pojedynczego
czas min-maks	(ang. <i>peak-to-peak time</i>) – czas mierzony pomiędzy minimalnym a maksymalnym wychyleniem zapisu potencjału czynnościowego jednostki motorycznej
EAAT	(ang. <i>excitatory amino acid transporters</i>) – białkowy system transporterów aminokwasów pobudzających
F	(ang. <i>fast</i>) – jednostka motoryczna szybko kurcząca się
fALS	(ang. <i>familial amyotrophic lateral sclerosis</i>) – postać rodzinna stwardnienia zanikowego bocznego
FatI	(ang. <i>fatigue index</i>) – wskaźnik zmęczenia
FF	(ang. <i>fast fatigable</i>) – jednostka motoryczna szybko kurcząca się, nieodporna na zmęczenie
FG	(ang. <i>fast glycolitic</i>) – włókna mięśniowe typu II B, szybkie, podatne na zmęczenie, glikolityczne
FOG	(ang. <i>fast oxidative-glycolitic</i>) – włókna mięśniowe typu II A, szybkie, odporne na zmęczenie tlenowo-glikolityczne
FR	(ang. <i>fast resistant</i>) – jednostka motoryczna szybko kurcząca się, odporna na zmęczenie
G93A	mutacja białka SOD1 polegająca na substytucji glicyny w miejsce alaniny w pozycji 93
GFAP	(ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>) – kwaśne białko włóknikowe
HRT	(ang. <i>half-relaxation time</i>) – czas połowicznego rozkurczu
hmSOD1	(ang. <i>human mutated SOD1</i>) – gen SOD1 człowieka z mutacją
i.p.	(łac. <i>intra peritoneum</i>) - dootrzewnowo

IGF	(ang. <i>insulin-like growth factor</i>) – insulinopodobny czynnik wzrostu
MGF	(ang. <i>mechano growth factor</i>) – mechaniczny czynnik wzrostu
MND	(ang. <i>Motor Neuron Disease</i>) – choroby neuronu ruchowego
PCR	(ang. <i>polimerase chain reaction</i>) – reakcja łańcuchowa polimerazy
PTP	(ang. <i>post-tetanic potentiation</i>) – wzmocnienie potężcowe
S	(ang. <i>slow</i>) – jednostka motoryczna wolno kurcząca się, odporna na zmęczenie
sALS	(ang. <i>sporadic amyotrophic lateral sclerosis</i>) – postać sporadyczna stwardnienia zanikowego bocznego
SLA	(łac. <i>sclerosis lateralis amyotrophica</i>) – stwardnienie zanikowe boczne
SO	(ang. <i>slow oxidative</i>) – włókna mięśniowe typu I, wolne tlenowe
SOD1	(ang. <i>superoxide dismutase type 1</i>) – dysmutaza ponadtlenkowa typu 1
SPF	(ang. <i>specific pathogen free</i>) – zwierzęta wolne od specyficznych patogenów występujących u danego gatunku
TetF	(ang. <i>tetanus force</i>) – siła skurczu tężcowego zupełnego
TGF-β1	(ang. <i>transforming growth factor beta1</i>) – transformujący czynnik wzrostu beta1
FUS (TLS)	(ang. <i>fused in sarcoma</i>) – białko FUS
TNF-α	(ang. <i>tumor necrosis factor</i>) – czynnik martwicy guza, czynnik martwicy nowotworów, kachektyna
Tw/Tet	(ang. <i>twitch-to-tetanus ratio</i>) – stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego
TwF	(ang. <i>twitch force</i>) – siła skurczu pojedynczego
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

Streszczenie

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) jest jedną z najbardziej powszechnych chorób neurodegeneracyjnych, charakteryzujących się postępującym zanikiem neuronów ruchowych. Objawy ALS obejmują: narastający zanik mięśni, ich osłabienie i porażenie, prowadzące ostatecznie do śmierci z powodu niewydolności oddechowej w czasie 2–5 lat. Większość przypadków ALS to tzw. postać sporadyczna (sALS, ang. *sporadic ALS*), o nieznannej etiologii. Szacuje się, że około 10% przypadków występuje rodzinnie i jest uwarunkowane genetycznie (fALS, ang. *familial ALS*), z czego 20% powstaje w efekcie mutacji w genie kodującym miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenukową typu 1 (SOD1, ang. *superoxide dismutase type 1*). Zachorowalność na ALS jest stosunkowo mała i wynosi 1-3 przypadków na 100 000 rocznie, z niewielką przewagą występowania u mężczyzn (ok. 1,4:1 w stosunku do kobiet).

Etiologia ALS nie jest znana. Jedynym potwierdzonym do tej pory czynnikiem ryzyka tej choroby jest uwarunkowanie genetyczne. Wysłano wiele hipotez na temat patogenezy ALS włączając ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, zaburzenie czynności mitochondriów, proces zapalny, odkładanie agregatów białkowych zawierających neurofilamenty i/lub agregacja innych białek, niedobór czynników wzrostu, zaburzenie transportu aksonalnego, nieprawidłowe dojrzewanie RNA. Dokładne mechanizmy leżące u podłoża ALS wciąż pozostają nieznanne. Przypuszcza się, że niezależnie od etiologii, są one takie same w fALS i sALS, oraz że jest to zjawisko kompleksowe i wieloczynnikowe.

Celem pracy było zbadanie zmian zachodzących w jednostkach motorycznych (ruchowych) mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki na transgenicznym modelu ALS u szczura z genem SOD1 człowieka (hmSOD1), z substytucją glicyny w miejsce alaniny w pozycji 93 (G93A), oraz progresji tych zmian, począwszy od okresu przedobjawowego

choroby do paraliżu. Analizowano zmiany proporcji poszczególnych typów jednostek motorycznych, cechy ich skurczu oraz cechy potencjałów czynnościowych jednostek.

W eksperymentach elektrofizjologicznych zostało przebadanych 314 jednostek motorycznych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki u 18 szczurów transgenicznych hmSOD1 (G93A) i 3 zdrowych dorosłych szczurów grupy kontrolnej. Zwierzęta transgeniczne zostały podzielone na 3 grupy: ALS I – trzymiesięczne szczury bez widocznych zaburzeń ruchowych (n=4), ALS II – czteromiesięczne szczury z pierwszymi widocznymi zaburzeniami ruchowymi w jednej lub dwóch kończynach (n=4), ALS III – prawie dwustudniowe szczury w końcowej fazie choroby, u których stymulacja nerwu wykazała średnio 6 jednostek ruchowych w badanym mięśniu (n=10). Procedury doświadczeń obejmowały czynnościową izolację pojedynczej jednostki motorycznej i badanie jej aktywności.

U zwierząt transgenicznych, począwszy od grupy ALS I, obserwowano istotne zaburzenia rozkładu czasu skurczu oraz występowania objawu ugięcia, cech na podstawie których zwykle dokonuje się klasyfikacji jednostek motorycznych na wolne (S, ang. *slow*) i szybkie (F, ang. *fast*). Z tych powodów podział jednostek na dwa typy oparto na wskaźniku 20 Hz – alternatywnej metodzie klasyfikacji jednostek ruchowych. Dalszy podział jednostek szybkich na szybkie męczące się (FF, ang. *fast fatigable*) oraz szybkie odporne na zmęczenie (FR, ang. *fast resistant*) przeprowadzono na podstawie wskaźnika zmęczenia.

Proporcja trzech typów jednostek ruchowych w grupie kontrolnej i doświadczalnej ALS I była podobna. Dalszy rozwój procesu chorobowego modyfikował proporcje poszczególnych typów jednostek ruchowych. W grupie ALS II obserwowano wzrost proporcjonalnego udziału jednostek ruchowych FF i S, z równoczesnym ograniczeniem liczby jednostek FR, ale u szczurów w ostatnim stadium choroby (ALS III) wzrosła proporcja jednostek S, kosztem mniejszego udziału jednostek szybkich, szczególnie FF. Zmiany czasu

skurczu i czasu połowiczego rozkurczu dotyczyły tylko jednostek szybkich obu typów i oba te parametry w grupie ALS II osiągały niższe wartości niż w grupie kontrolnej. Zmiany parametrów czasowych skurczu wpływały na przebieg krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń. Dla jednostek FF strome części tych krzywych przesunęły się w stronę wyższych częstotliwości stymulacji (najbardziej w prawo przesunięta była krzywa jednostek FF grupy ALS II). Populacja jednostek ruchowych zwierząt transgenicznych stopniowo ulegała ujednoczeniu pod względem odporności na zmęczenie, ponieważ współczynnik zmęczenia jednostek FR i S obniżał się wraz z rozwojem ALS. Siła skurczu pojedynczego jednostek FF zwierząt transgenicznych była niższa we wszystkich grupach, natomiast dla jednostek S w grupie ALS III wartość tego parametru była trzykrotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Wzrost siły jednostek S był prawdopodobnie efektem reinerwacji przez ich aksony odnerwionych szybkich włókien mięśniowych, co było także odzwierciedlone przez wzrost amplitudy potencjałów czynnościowych jednostek wolnych. Analiza EMG wykazała dodatkowo wydłużenie latencji potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych wszystkich typów u szczurów transgenicznych, co związane było ze spowolnieniem przewodnictwa nerwów obwodowych i/lub procesów przewodnictwa w płycie ruchowej.

Podsumowując, rozwój choroby na modelu ALS u szczura wiąże się z dynamicznymi, wielokierunkowymi zmianami cech skurczu jednostek motorycznych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki. Charakter, kierunek oraz tempo zmian zależą od typu jednostek ruchowych oraz etapu choroby. W pierwszym okresie choroby (ALS I) zmiany występowały tylko w układzie nerwowym (w aksonach motoneuronów). W dalszym etapie (ALS II), obserwowano zmiany w układzie nerwowym oraz mięśniowym, które w odniesieniu do tkanki mięśniowej można zinterpretować jako odpowiedź na przeciążenie czynnych jednostek ruchowych w związku z postępującym zanikiem mięśni, a zmiany cech skurczu i proporcji

dotyczyły jednostek szybkich, głównie FF. W ostatnim etapie choroby (ALS III), gdy miało miejsce porażenie, obserwowano zanik jednostek szybkich, zwłaszcza FF i wyraźne zmiany cech skurczu oraz potencjałów czynnościowych jednostek typu S. Mimo, że zwyrodnienie w ALS dotyczy wszystkich motoneuronów, największe motoneurony jednostek FF wydają się być najbardziej podatne na proces chorobowy. Zmiany ich cech były najgłębsze i w ostatniej fazie choroby proporcja jednostek tego typu była istotnie zmniejszona. Najmniejsze motoneurony jednostek wolnego typu przeżywały dłużej w porównaniu do motoneuronów jednostek szybkich, a istotne zmiany ich cech wynikały z faktu, że jednostki tego typu pod koniec procesu chorobowego efektywnie reinerwują odnerwione włókna mięśniowe jednostek szybkich.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is one of the most common, fatal neurodegenerative diseases, characterized by progressive death of motoneurons. The symptoms of the disease include: increasing muscle atrophy, weakness and paralysis, finally leading to death due to respiratory failure within 2-5 years. Most of ALS cases occur sporadically (sALS), but about 10% are familial (inherited) (fALS) and of these, about 20% are an effect of a mutation in the gene encoding Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1). The incidence of ALS is relatively small (1-3 per 100 000 annually) and occurs with a slight excess of males (the ratio of males to females is about 1.4:1).

Etiology of the ALS is unknown, only some genetic risk factors have been confirmed so far. Many putative pathogenesis theories have been proposed, including excitotoxicity, oxidative stress, mitochondrial and/or inflammatory dysfunction, neurofilament and/or other protein inclusions, deficits in neurotrophic factors, impaired axonal transport, altered RNA metabolism. However, the exact mechanisms of the ALS still remain unclear. Probably they are the same in sALS and fALS irrespective on the etiology, and likely form a complex, multifactorial pathogenesis.

The aim of the study was to investigate changes in properties of motor units (MUs) in the medial gastrocnemius muscle of transgenic rats with human SOD1 (G93A) mutation and their progression from healthy to completely paralysed animals. In order to precisely describe these changes, the following factors were analyzed: the distribution of particular types of MUs, the MUs contractile properties and parameters of the MUs action potentials.

The electrophysiological experiments were carried out on 314 MUs of the medial gastrocnemius muscle in 18 transgenic rats with hmSOD1 (G93A) and 3 healthy, adult rats (control). The transgenic animals were divided into the three groups: ALS I – 3-months old rats without visible motor deficits (n=4), ALS II – 4-months old rats with the first visible

motor deficits in one or two limbs (n=4) and ALS III – approximately 200-days old rats, in nearly terminal state, when nerve stimulation revealed on average 6 MUs in the studied muscle (n=10). Experimental procedures included a functional isolation of single MUs and recording of their activity.

In transgenic animals considerable disturbances in the range of contraction times and disappearance of a sag effect (parameters usually applied for physiological classification of MUs as slow (S) or fast (F)) were observed. Therefore, the division of MUs was based on the 20 Hz tetanus index – an alternative method for MUs division. For further classification of fast MUs into fast fatigable (FF) and fast resistant (FR) the fatigue index was applied.

The proportion of the three MUs types in control and ALS I groups was similar. However, proportion of MUs was radically modified by further progression of the disease. In ALS II group an increase of a relative number of FF and S MUs and simultaneous decrease of FR MUs were noted, but in animals in the terminal state (ALS III) an increase in proportion of S and a decrease of fast (especially FF) MUs were observed. The changes of contraction and half-relaxation times concerned only fast MUs, and these parameters were shorter in comparison to the control group in ALS II. These results influenced the course of the force-frequency curves, and for FF MUs the steep part of the curve was shifted towards higher stimulation frequencies (the most significantly for ALS II). Population of MUs became unified with respect to fatigue resistance because the fatigue index for FR and S MUs gradually decreased during progression of the disease. The twitch force for FF MUs decreased, but for the S ones the mean twitch force was three times higher in ALS III. This increase of the S MUs' force was probably an effect of a sprouting of its axons and collateral reinnervation of denervated fast muscle fibres. This also led to the increase in amplitude of action potentials in S MUs. EMG analysis additionally showed a prolonged latency of action

potentials in all types MUs caused by slowing of a peripheral nerve conduction velocity and/or motor plate transduction.

In conclusion, progression of the disease in a rat's model of ALS in the medial gastrocnemius muscle is related with considerable, fast developing and multidirectional changes in MUs' contractile properties. The nature, direction and speed of the mentioned changes depended on the MU type as well as the stage of the disease. In the first stage (ALS I) changes were observed only within the nervous system (axons of motoneurons). In the further stage (ALS II), changes in nervous and muscle systems were noted and in muscles likely resulted from the functional overload of surviving MUs. In this stage changes in proportion of MUs and their contractile properties concerned especially the FF type. In the terminal phase of ALS (ALS III), when rats became paralysed, a massive degeneration of the FF MUs was observed and considerable changes in contractile properties and MU action potentials were noted in S MUs. Despite the disease concerns all motoneurons, the largest, belonging to the FF MUs, are probably the most prone to disease process. The contractile properties of FF MUs were the most severely impaired and their proportion was significantly decreased in the terminal state of the disease. The smallest motoneurons of a slow type survived longer than other types, whereas considerable changes in contractile properties of slow MUs resulted from their capacity for collateral reinnervation.

1. Wstęp

1.1. Stwardnienie zanikowe boczne

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*; SLA, łac. *sclerosis lateralis amyotrophica*) jest chorobą neurodegeneracyjną, charakteryzującą się selektywnym, stopniowym i postępującym zwyrodnieniem neuronów ruchowych kory mózgu, szlaków korowo-rdzeniowych, pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego (z wyjątkiem motoneuronów odpowiadających za ruchy gałki ocznej i unerwiających pęcherz moczowy). Proces degeneracji motoneuronów stanowi podłoże pojawiających się i postępujących niedowładów oraz zaników mięśniowych. W konsekwencji doprowadza do paraliżu, który ostatecznie obejmuje mięśnie oddechowe i prowadzi do śmierci w czasie 2-5 lat od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych (Grieb, 2005; Herbiak, 2008; Wijesekera i Leigh, 2009; Barber i Shaw, 2010).

Na świecie choroba ta jest znana pod kilkoma nazwami. Pierwszy dokładny opis klasycznego ALS został opublikowany w 1869 roku przez francuskiego neurologa Charcota i jego ucznia Joffroy'a, stąd, szczególnie we Francji, choroba ta często nazywana jest „chorobą Charcota”. Dla upamiętnienia słynnego bejsbolisty Henry'ego Louisa Gehriga, zmarłego z powodu ALS w 1941 roku, stwardnienie zanikowe boczne w USA określa się mianem „choroby Lou Gehriga” (Rafałowska, 1999; Herbiak, 2008). Przez niektórych autorów ALS określane jest chorobą neuronu ruchowego (MND, ang. *Motor Neuron Disease*) ze względu na komórki preferencyjnie obejmowane procesem chorobowym (Mitchell i wsp., 1995; Worms, 2001; Talbot, 2002; Shaw, 2005), przez innych zaliczane jest do szerokiej grupy różnych chorób pod wspólną nazwą MND (Hirano i Llena, 1983; Nelson i wsp., 2000b). Ta różnorodność w nazewnictwie może wywoływać szereg nieporozumień. Aktualnie, w książce pod redakcją Browna i współautorów (Murray i Mitsumoto, 2006) zaproponowano objęcie

nazwą MND różnych jednostek chorobowych, wzajemnie się pokrywających, z których część dotyczy tylko ruchowej części układu nerwowego, inne natomiast w mniejszym lub większym stopniu dotyczą pozaruchowej jego części. Do chorób tych zalicza się ALS, ale również demencję, postępujące porażenie nadjądrowe czy parkinsonizm.

Zachorowalność na ALS jest stosunkowo niska i wynosi 1-3 przypadków na 100 000 rocznie (Worms, 2001; Andersen, 2006a), z niewielką przewagą występowania u mężczyzn (ok. 1,4:1 w stosunku do kobiet) (Worms, 2001; Logroscino i wsp., 2008). Pierwsze objawy chorobowe pojawiają się zwykle między 5 a 7 dekadą życia (Nelson i McGuire, 2006; Wijesekera i Leigh, 2009).

Większość przypadków tej choroby (ok. 90%) to tzw. postać sporadyczna (sALS, ang. *sporadic ALS*), której przyczyna nie jest znana. Pozostałe 10% przypadków jest uwarunkowane genetycznie, występuje u osób spokrewnionych i nosi nazwę postaci rodzinnej ALS (fALS, ang. *familial ALS*). Najczęściej ALS dziedziczone jest w sposób autosomalny dominujący, rzadko autosomalny recesywny oraz sprzężony z chromosomem X (Andersen, 2006a; Murray i Mitsumoto, 2006). Na podstawie badań klinicznych nie jest możliwe rozróżnienie postaci genetycznej od sporadycznej. Około 20–25% rodzinie występującego ALS jest związane z mutacją w genie miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej typu 1 (SOD1) (Rosen i wsp., 1993; Andersen, 2006b). Inne, mniej liczne mutacje odpowiedzialne za rodzinną postać ALS dotyczą genów: ALS2, SETX (ang. *senataxin*), VAPB (ang. *VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C*), TARDBP (ang. *TAR DNA binding protein*). Mutacje w genach zwiększające ryzyko zachorowania na ALS obejmują: ANG (ang. *angiogenin*), DCTN1 (ang. *dynactin 1*), CHMP2B (ang. *chromatin modifying protein 2B gene*), NEFH (ang. *neurofilament, heavy polypeptide*), PRPH (ang. *peripherin*), SMN1 (ang. *survival of motor neuron 1, telomeric*), SMN2 (ang. *survival of motor neuron 2, centromeric*), MAPT (ang. *microtubule-associated protein tau*) (Shaw, 2005;

Andersen, 2006a; Mitchell i Borasio, 2007; Cozzolino i wsp., 2008; Wijesekera i Leigh, 2009).

W pewnych obszarach geograficznych (wyspa Guam w archipelagu Wysp Mariańskich i japoński półwysep Kii) występuje choroba podobna do ALS nazywana „guamańską postacią ALS” i „postacią z Kii”. Na obraz kliniczny oprócz objawów typowych dla ALS składają się niekiedy dodatkowo objawy otępienne i zespół parkinsonowski. Zachorowalność mieszkańców wyspy Guam na ALS była w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku 50-100 razy wyższa niż na świecie, następnie stopniowo spadała (Plato i wsp., 2003). Przyczyn tej postaci upatruje się w czynnikach środowiskowych. Postulowano między innymi wpływy niedoboru wapnia i magnezu w wodzie gruntowej, czy szeregu toksycznych związków w nasionach drzew z rodziny sagowcowatych, z których wykonywano mąkę (Shaw i Höglinger, 2008).

Obecnie, na podstawie objawów początkowych wyróżnia się cztery odmienne klinicznie postaci ALS: 1) zespół imitujący rdzeniowy zanik mięśni; 2) pierwotne stwardnienie boczne; 3) postępujące porażenie opuszkowe; 4) zespół zasadniczy – stwardnienie zanikowe boczne. U podstaw tych odmian leży jednak ten sam proces patofizjologiczny, obserwuje się podobne zmiany histopatologiczne, a po początkowych selektywnych objawach (ze strony neuronu ruchowego górnego lub dolnego) pojawiają się także zaburzenia ze strony różnych pięter układu nerwowego (Rafałowska, 1999).

W klasycznej postaci ALS zmiany chorobowe rozwijają się zarówno w górnych jak i dolnych kończynach, z objawami opuszkowymi (zmiany w mięśniach unerwianych przez nerwy wychodzące z rdzenia przedłużonego) lub bez nich. Początek choroby zwykle dotyczy ograniczonego osłabienia mięśni w jednej kończynie i następnie rozszerza się na pozostałe regiony, ale około 25% przypadków charakteryzuje się początkiem opuszkowym, z pierwszymi objawami w postaci dysfagii (utrudnione gryzienie lub połykanie) i/lub dysartrii

(bełkotliwa lub nosowa mowa), a często również ślinotoku. W rzadkich przypadkach pierwszym objawem może być niewydolność oddechowa, pojawiająca się w efekcie zajęcia neuronów ruchowych szyjnego i piersiowego odcinka rdzenia kręgowego (Murray i Mitsumoto, 2006; Kiernan i wsp., 2011). Rozpoznanie ALS nie sprawia problemów gdy choroba jest zaawansowana, natomiast jest dużym wyzwaniem w początkowym jej etapie. Główną trudnością jest brak specyficznych biomarkerów ALS (Turner i wsp., 2009) i konieczność oparcia diagnozy na badaniach klinicznych, czyli w konsekwencji potrzeba wykluczenia wielu innych chorób, np.: opuszkowo-rdzeniowego zaniku mięśni czy wieloogniskowej neuropatii ruchowej (Benatar, 2006). Dodatkowo choroba ta charakteryzuje się występowaniem fazy przedklinicznej, gdzie ubytki neuronów ruchowych są kompensowane procesami reinerwacji obocznej z komórek nie objętych jeszcze zmianami chorobowymi i nie ma dostrzegalnych objawów choroby, mimo toczącego się procesu zwyrodnienia motoneuronów. Objawy kliniczne pojawiają się dopiero wówczas, gdy procesy kompensacji są niewystarczające i liczba ginących neuronów ruchowych jest zbyt duża (Murray i Mitsumoto, 2006; Pun i wsp., 2006; Dadon-Nachum, 2011). Często objawy początkowe są tak niewielkie (np. drżenia lub sztywność mięśni, niezgrabność ruchów, częstsze potykanie się, trudności w prostych czynnościach, jak zapinanie guzików czy odwracanie klucza w zamku), że ich pojawienie się jest bagatelizowane lub wręcz przez pacjentów niezauważane. Z tych względów postawienie diagnozy i potwierdzenie ALS może trwać nawet do 12-14 miesięcy (Oliveira i Pereira, 2009; Kiernan i wsp., 2011). Obecnie obowiązują kryteria rozpoznania ALS z 1998 roku (El Escorial, 1998). Diagnostyka ALS opiera się o badania kliniczne i elektrofizjologiczne, które pozwalają na określenie stopnia pewności rozpoznania choroby. Do rozpoznania ALS wymagana jest obecność: 1) objawów uszkodzenia dolnego neuronu ruchowego w badaniu klinicznym, elektrofizjologicznym lub neuropatologicznym; 2) objawów uszkodzenia górnego neuronu ruchowego w badaniu

klinicznym; oraz 3) progresji choroby w danym regionie anatomicznym lub pojawienia się objawów w nowym regionie. Uwzględnić należy obecność (lub brak) wyżej wymienionych objawów w czterech regionach anatomicznych: opuszkowo-czaszkowym, szyjnym, piersiowym i lędźwiowo-krzyżowym. Na tej podstawie określa następujące stopnie pewności rozpoznania ALS: 1) klinicznie pewne ALS; 2) klinicznie prawdopodobne ALS; 3) klinicznie możliwe ALS (Brooks i wsp., 2000; Adamek i Tomik, 2005).

Proces rozwoju klasycznej formy ALS jest przewidywalny. Zwykle po pojawieniu się pierwszych objawów w konkretnym regionie, rozszerzają się one w tej samej osi mózgowo-rdzeniowej, tzn. najpierw objawy pojawiają się w obrębie jednego segmentu rdzenia, a potem dopiero przenoszą się na następne. Dlatego początkowe objawy dotyczące np. górnej kończyny sugerują, że najprawdopodobniej w dalszej kolejności zajęta zostanie kończyna przeciwna, a dopiero później kończyny dolne czy segmenty szyjne rdzenia (objawy ze strony mięśni oddechowych). Podobnie w przypadku początku choroby w opuszce rdzenia kręgowego po pojawieniu się objawów opuszkowych zajęte zostają kończyny górne i na końcu segmenty piersiowe oraz lędźwiowe rdzenia (kończyny dolne) (Murray i Mitsumoto, 2006).

Cechą charakterystyczną ALS jest współwystępowanie objawów ze strony górnego i dolnego neuronu ruchowego, czyli równoczesnych spastyczności, osłabienia mięśni, ich zaniku oraz wygórowanych odruchów mięśniowych, często z drzeniami i/lub kurczami mięśniowymi. Często widoczne są objawy towarzyszące w postaci: utraty masy ciała, bólów stawowych, depresji, niepokoju, a w przypadku objęcia mięśni oddechowych – duszności wysiłkowej, prawidłowego oddychania tylko w pozycji stojącej, czy zaburzeń snu. Brak jest natomiast objawów dotyczących czuciowej części układu nerwowego, co jest jednocześnie cechą typową dla ALS (Mitchell i Borasio, 2007). Należy podkreślić, że zajęcie obu

neuronów ruchowych (górnego i dolnego) jest także charakterystyczne dla ALS, ale nie znaczy to, że pojawia się równocześnie (Rafałowska, 1999; Murray i Mitsumoto, 2006).

1.1.1. Etiologia

Etiologia ALS nie jest znana. Jedynym potwierdzonym, jak do tej pory, czynnikiem ryzyka tej choroby jest uwarunkowanie genetyczne. Wielu autorów sugerowało także inne czynniki ryzyka, lecz dane literaturowe odnośnie wielu z nich są niejednoznaczne lub nawet sprzeczne. Shaw i Höglinger (2008) zaproponowali w swojej pracy kryteria identyfikacji czynników środowiskowych (neurotoksyn) jako czynników sprawczych chorób neurodegeneracyjnych. Klasyfikacja danego czynnika środowiskowego jako czynnika ryzyka powinna odbywać się w czterech etapach: 1) potwierdzenie ważności epidemiologicznej danego czynnika, tj. kliniczne i patologiczne zmiany odpowiadające danej jednostce chorobowej w wyniku ekspozycji na dany czynnik muszą występować u pojedynczych osób lub określonej ludzkiej populacji; 2) identyfikacja czynnika, tj. musi być zakończony proces izolacji, oczyszczania i ustalania budowy strukturalnej danego czynnika, neurotoksyna musi mieć udokumentowaną zdolność przenikania do centralnego układu nerwowego, jak również w realnych warunkach wykazywać niezbędne dawki i długość ekspozycji; 3) eksperymenty *in vivo*, tj. zwierzęta laboratoryjne poddane działaniu danego czynnika muszą odzwierciedlać chorobę ludzką, biorąc pod uwagę zmiany histopatologiczne jak i behawioralne; 4) wygaśnięcie choroby spowodowane profilaktyką, tj. zaprzestanie ekspozycji na neurotoksyczny czynnik powinno powodować wygaśnięcie choroby (Shaw i Höglinger, 2008). W odniesieniu do ALS niektórych prawdopodobnych czynników ryzyka nie da się jednak przebadać w powyższy sposób, a część badań epidemiologicznych nad tą chorobą ma charakter ankietowy. Przypuszczalnie choroba ta ma podłoże wieloczynnikowe (nie da się wyróżnić jednego konkretnego czynnika sprawczego), a także poszczególne czynniki mogą ze

sobą wzajemnie oddziaływać modyfikując swoje działania. Biorąc pod uwagę powyższe trudności, w żadnych badaniach nie wykazano bezsprzecznie związku konkretnego czynnika egzogenego z pojawieniem się ALS, raczej związek taki określa się jako prawdopodobny.

Jednakże spośród czynników mogących mieć wpływ na rozwój ALS wymienia się m.in.:

- a) kontakt z toksynami (m.in.: ołów, aluminium, kadm, żelazo, substancje chemiczne w rolnictwie) – podwyższony poziom ołowiu notowano w płynie mózgowo-rdzeniowym i osoczu u pacjentów chorujących na ALS; dooportunowe podawanie królikom niskich dawek aluminium wywoływało w rdzeniu kręgowym zmiany ultrastrukturalne, które były nie do odróżnienia od tych występujących w ALS; duże znaczenie przypisuje się też metalotioneinie – białku, które odpowiedzialne jest za kumulowanie niezbędnych pierwiastków śladowych oraz jonów metali ciężkich, które w ten sposób zostają wyłączone z metabolizmu – pacjenci chorzy na ALS mają wyższe stężenie metalotioneiny w nerkach i wątrobie, a jej immunoreaktywność jest wyższa w rdzeniu kręgowym u osób chorych w porównaniu do zdrowych (Roos i wsp., 2006); w odniesieniu do metabolizmu żelaza wykazano przede wszystkim podwyższony poziom ferrytyny w osoczu, co może wskazywać, że w ALS metabolizm tego pierwiastka jest zaburzony (Qureshi i wsp., 2008); w wielu publikacjach sugerowano również związek pomiędzy występowaniem ALS a kontaktem z ołowiem, jego podwyższonym stężeniem w kościach oraz we krwi (Armon i wsp., 1991; Kamel i wsp., 2005), choć paradoksalnie w ostatnich latach wykazywano, że narażenie na ołów może opóźnić progresję choroby (Kamel i wsp., 2008; Barbeito i wsp., 2010);
- b) urazy np. sportowe – szereg badań analizujących potencjalne czynniki ryzyka ALS wskazuje na duże znaczenie urazów głowy jako czynnika prowokującego lub przyspieszającego rozwój tej choroby. Chen i współautorzy (2007) wykazali nawet 11 – krotnie wyższe ryzyko zachorowania u osób doświadczających wielokrotnych urazów

głowy w ciągu dziesięciu lat poprzedzających badanie, ale statystycznie istotny wzrost ryzyka notowano również u osób mających w przeszłości więcej niż jeden uraz głowy oraz u takich, u których uraz głowy miał miejsce w ciągu ostatnich dziesięciu lat. Z drugiej strony, dokładna analiza publikacji z lat 2002 – 2006 dotyczących związku sportu i urazów z ALS (Armon, 2007) wykazała szereg błędów metodologicznych i poddała w wątpliwość wyniki prac wskazujących uprawianie sportu jako prawdopodobnego czynnika ryzyka ALS. W konkluzji tej pracy stwierdzono, że urazy i aktywność fizyczna prawdopodobnie nie są czynnikami ryzyka tej choroby;

- c) palenie papierosów – jego wpływ na ryzyko zachorowania wykazano w badaniach porównawczych przypadków (Kamel i wsp., 1999; Nelson i wsp., 2000b), oraz szeroko zakrojonych badaniach kohortowych (Weisskopf i wsp., 2004; Fang i wsp., 2006), choć z drugiej strony w innych badaniach nie znaleziono istotnych związków między paleniem a zachorowalnością na ALS (Mitchell i wsp., 1995);
- d) nawyki żywieniowe i dietę – wykazano np.: wprost proporcjonalną zależność między ryzykiem wystąpienia ALS i spożyciem tłuszczów oraz zmniejszone ryzyko wraz ze spożywaniem większej ilości błonnika pokarmowego. Spożywanie glutaminianu zwiększało ryzyko zachorowania natomiast dieta bogata w witaminy i suplementy nie miała wpływu na rozwój ALS (Nelson i wsp., 2000a); w innych badaniach Morozova i współautorzy (2008) wykazali zależność odwrotnie proporcjonalną między spożywaniem kurczaków a ryzykiem ALS, zwiększone ryzyko u osób spożywających dużo brązowego ryżu, produktów razowych, kaszy jęczmiennej oraz kawy bezkofeinowej, obniżone natomiast u osób, których dieta bogata była w herbatę i frytki. Wszystkie te zależności (za wyjątkiem spożywania drobiu) okazały się nieistotne statystycznie po teście porównań wielokrotnych;

e) wysoką aktywność fizyczną zarówno w miejscu pracy jak i w czasie wolnym – postulowanie i badanie związku pomiędzy zwiększoną aktywnością fizyczną i ryzykiem ALS ma podłoże w hipotezach dotyczących patogenezы tej choroby, które dotyczą roli zwiększonego stresu oksydacyjnego i ekscytotoksyczności. Nie bez wpływu na zainteresowanie wysiłkiem fizycznym w tym kontekście pozostają też znane na całym świecie przypadki sportowców chorujących na ALS: m.in. Lou Gehrig (bejsbolista), Matt Hazeltine (piłkarz), Ezzard Charles (bokser). Wyniki dotychczasowych analiz tego zagadnienia nie są zgodne, jedne przedstawiają statystycznie istotny związek pomiędzy uprawianiem sportu a zachorowalnością na ALS (Scarmeas i wsp., 2002), inne takiej zależności nie wykazują (Longstreth i wsp., 1998; Veldink i wsp., 2005). Należy również mieć na uwadze, że uprawianie sportu i zwiększona aktywność fizyczna mogą wiązać się z narażeniem na inne czynniki ryzyka m.in. rozmaite toksyny, środki dopingujące czy urazy, co może wpływać na wyniki badań.

Sugerowano również takie egzogenne czynniki jak: uraz elektryczny (porażenie prądem lub piorunem), poprzedzająca infekcja wirusem polio, czy zwiększone ryzyko zachorowania na ALS u weteranów wojny w zatoce perskiej oraz czynniki endogenne jak np. wiek czy płeć (Wijesekera i Leigh, 2009).

1.1.2. Patogeneza

Podobnie jak w przypadku etiologii, nie jest również znany dokładny mechanizm patogenetyczny ALS, choć wysunięto wiele hipotez na ten temat m.in.:

- a) ekscytotoksyczność – kwas glutaminowy (i przeważający w warunkach fizjologicznych jego anion karboksylowy – glutaminian), naturalnie występujący w organizmie neuroprzebieżnik pobudzający, w dużych stężeniach staje się toksyczny dla komórek nerwowych. Nadmiar tego aminokwasu powoduje zwiększoną stymulację

postsynaptycznych receptorów glutaminianergicznych, co aktywuje nadmierny, szkodliwy dla komórki napływ jonów wapnia do jej wnętrza (motoneurony w porównaniu do innych komórek nerwowych mają mniejszą zdolność buforowania jonów wapnia, stąd prawdopodobnie wynika ich preferencyjne obumieranie w ALS). Jony wapnia aktywują w komórce proteazy, fosfolipazy i inne enzymy, powodujące degradację błon i białek oraz nadprodukcję wolnych rodników (Salińska i wsp., 2005; Herbiak, 2008). U części pacjentów z MND notowano znacząco wyższe stężenie glutaminianu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Stężenie to było ponad dwukrotnie (a w kilku przypadkach nawet ponad siedmiokrotnie) wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (Shaw i wsp., 1995). Potwierdzeniem patogenetycznej ekscytotoksyczności glutaminianu w ALS jest również skuteczność riluzolu (jedynego skutecznego do tej pory leku wydłużającego życie) na modelu zwierzęcym, jak i u pacjentów z ALS (o 2 – 3 miesiące). Lek ten hamuje uwalnianie kwasu glutaminowego (Pasinelli i Bown, 2006). Ponadto transgeniczne gryzonie oraz znaczna część chorych z sALS (65%) charakteryzują się ograniczeniem ekspresji i aktywności białkowego systemu transporterów aminokwasów pobudzających klasy drugiej (EAAT2) w korze mózgu i rdzeniu kręgowym. Transportery EAAT występują w większości astrosynaps ośrodkowego układu nerwowego i są odpowiedzialne za wychwyt glutaminianu z przestrzeni synaptycznej po jego uwolnieniu w czasie neurotransmisji i dalszy transport tego neurotransmitera do astrocytów. EAAT2 reguluje w 90% zewnątrzkomórkowe stężenie glutaminianu, tym samym ograniczenie jego aktywności powoduje uruchomienie procesów ekscytotoksyczności (Pasinelli i Bown, 2006; Cozzolino i wsp., 2008). Podobne zmiany EAAT2 opisano w chorobie Alzheimera oraz innych zaburzeniach neurologicznych (Danbolt, 2001) i dlatego nie można ich traktować jako cechy specyficznej dla ALS;

b) stres oksydacyjny – tym terminem określa się zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją i działaniem reaktywnych form tlenu i azotu, a biologicznymi mechanizmami detoksykacji produktów reaktywnych i przywracaniem równowagi metabolicznej. Większość reaktywnych form tlenu powstaje jako produkt uboczny w czasie normalnego oddychania tlenowego, ale niewielki odsetek ponadtlenków jest produkowany również przez niektóre enzymy m.in. oksydazę ksantynową, cytochromy P450 czy oksydazy NADPH (Barber i Shaw, 2010). Jednym z markerów stresu oksydacyjnego są grupy karbonylowe białek – oznaczając ich ilość można ocenić oksydacyjne uszkodzenia białek organizmu. Podwyższony poziom tych grup notowano u pacjentów z sALS w rdzeniu kręgowym (Shaw i wsp., 1995; Niebrój-Dobosz i wsp., 2004), oraz korze mózgu (Ferrante i wsp., 1997). Podobnie markery oksydacji lipidów i DNA w rdzeniu kręgowym pacjentów wskazują na duże znaczenie stresu oksydacyjnego w patomechanizmie ALS. Analogiczne badania markerów przeprowadzono także na zwierzęcym modelu ALS (myszy z mutacją białka SOD1), gdzie potwierdzono występowanie stresu oksydacyjnego nie tylko w układzie nerwowym, ale również w mięśniach szkieletowych (Cozzolino i wsp., 2008). Oprócz wymienionych wyżej badań pośmiertnych, które obrazują zmiany tylko w końcowym etapie rozwoju choroby, wiele prac podejmowało analizę składu płynu mózgowo-rdzeniowego czy osocza krwi, umożliwiającą zbadanie stanu pacjentów we wcześniejszych etapach choroby. W badaniach tych stwierdzono podwyższone poziomy wielu markerów stresu oksydacyjnego w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na ALS (Barber i Shaw, 2010) oraz obniżony w osoczu poziom kwasu moczowego, będącego silnym antyoksydantem (Keizman i wsp., 2009), co wskazuje na zaburzoną równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną. Niestety, badacze wciąż nie są zgodni czy stres oksydacyjny jest pierwotną przyczyną zwyrodnienia komórek nerwowych, czy tylko następstwem innych procesów patogenetycznych stanowiących czynnik sprawczy choroby.

Wiadomo, że motoneurony w stosunku do innych komórek nerwowych mają duże rozmiary, co warunkuje ich duże zapotrzebowanie metaboliczne i szczególną podatność na stres oksydacyjny (Barber i Shaw, 2010). Warto pamiętać, że intensywny wysiłek fizyczny (np. sportowy) jest także źródłem silnego stresu oksydacyjnego (Vollaard i wsp., 2005; Nikolaidis i wsp., 2008; Powers i Jackson, 2008), co mogłoby wskazywać na przyczyny możliwego związku wysiłku fizycznego z wystąpieniem sALS. Należy jednak zaznaczyć, iż mimo ewidentnych dowodów szkodliwego działania reaktywnych form tlenu w przebiegu ALS, brak jest wyników wskazujących na korzystne oddziaływanie antyoksydantów w badaniach klinicznych. Wiele substancji mających działanie antyoksydacyjne, np. witamina E, koenzym Q₁₀, selegilina, mimo pozytywnych efektów w badaniach na modelach zwierzęcych, w badaniach klinicznych nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Należy zaznaczyć, że stres oksydacyjny (podobnie jak zmiany systemu EAAT2) nie jest specyficzną cechą ALS, ale pojawia się również w innych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego często współistniejąc z ekscytotoksycznością;

- c) zaburzenie struktury i czynności mitochondriów – nieprawidłową budowę mitochondriów (powiększone mitochondria z rozdętymi i zdezorganizowanymi grzebieniami mitochondrialnymi, przeciekaniem lub przerwaniem błony zewnętrznej oraz ich wakuolizację), a także zmiany w ich transporcie wykazano w motoneuronach, mięśniach i hepatocytach u pacjentów, na zwierzęcym modelu ze zmutowanym białkiem SOD1 u myszy oraz w hodowlach komórkowych (Kong i Xu, 1998; Grieb, 2004; Shaw, 2005). Zmiany funkcji mitochondriów w przebiegu ALS również były wielokrotnie opisywane, m.in. w postaci zaniku potencjału błonowego mitochondrium, obniżonej aktywności łańcucha oddechowego, zaburzeń w homeostazie wapnia czy ograniczeniu mitochondrialnych mechanizmów antyoksydacyjnych (Wiedemann i wsp., 1998; Dhaliwal

i Grewal, 2000; von Lewinski i Keller, 2005; Barber i Shaw, 2010; Shi i wsp., 2010). Ponadto mitochondrialne DNA u pacjentów z sALS charakteryzuje się dużą liczbą rozmaitych mutacji (Shaw, 2005). Z drugiej strony uzyskano dowody, że powyższe nieprawidłowości nie są specyficzne dla ALS, ale pojawiają się z podobnym nasileniem również u pacjentów z neurogennymi zmianami jak: polineuropatie, radikulopatie i rdzeniowy zanik mięśni (Krasnianski i wsp., 2005; Hirano i wsp., 2008);

- d) zaburzenia transportu aksonalnego – biosynteza makromolekuł zachodzi niemal wyłącznie w ciele komórkowym, dlatego ich transport odgrywa kluczową rolę szczególnie w motoneuronach, których aksony są najdłuższe i najgrubsze spośród wszystkich komórek nerwowych. Spowolnienie wolnego transportu aksonalnego niektórych protein (m.in. tubuliny i podjednostek L, M, H neurofilamentów) notowano sześć miesięcy przed początkiem objawów chorobowych w trzech populacjach myszy posiadających zmutowane białko SOD1 (G37R, G85R i G93A), przy czym w jednej z nich spowolnienie to pojawiało się przed jakimikolwiek innymi zmianami patologicznymi (Kong i Xu, 1998; Williamson i Cleveland, 1999; Rao i Nixon, 2003; Kieran i wsp., 2005; Shi i wsp., 2010). Dodatkowo u myszy z mutacją SOD1 o charakterze G93A obserwowano również upośledzenie szybkiego transportu aksonalnego (Rao i Nixon, 2003);
- e) odkładanie agregatów białkowych zawierających neurofilamenty – filamenty pośrednie między mikrotubulami a mikrofilamentami, pełnią w komórce nerwowej rolę podporową (utrzymują kształt komórki), a ich nieprawidłowe łączenie się i akumulacja jest charakterystyczną, patologiczną cechą obserwowaną w motoneuronach rdzenia kręgowego pacjentów chorych na ALS oraz transgenicznych myszy z mutacją białka SOD1 (Williamson i Cleveland, 1999; Kong i Xu, 2000; Rao i Nixon, 2003; Grieb, 2004; Shaw, 2005; Barber i Shaw, 2010). Prawdopodobnie przyczyną tworzenia nietypowych agregatów jest zmniejszona ekspresja podjednostki L neurofilamentów (obserwowana u

pacjentów z sALS i fALS, myszy transgenicznych i w hodowlach komórkowych), która jest niezbędna dla prawidłowego gromadzenia podjednostek H i M (Barber i Shaw, 2010). Wiadomo, że patologiczne odkładanie agregatów neurofilamentów prowadzi do upośledzenia transportu aksonalnego, zwłaszcza wolnego i następuje równoległe ze zmniejszaniem się średnicy aksonu i początkiem ograniczeń motorycznych (Cozzolino i wsp., 2008). Ciągle jednak bez odpowiedzi pozostaje pytanie podstawowe: czy akumulacja neurofilamentów oraz innych związków jest tylko produktem ubocznym toczącego się procesu patologicznego (być może pełniącym nawet rolę protekcyjną w stosunku do komórek nerwowych poprzez wiązanie związków dla nich toksycznych), czy jest ona istotną częścią tego procesu;

- f) agregacja innych białek – charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych, w tym również dla ALS, białkowe agregaty tworzą się nie tylko poprzez nieprawidłowe odkładanie neurofilamentów. Opisano szereg innych związków wchodzących w skład takich wtrętów (Cozzolino i wsp., 2008; Barber i Shaw, 2010). Najczęściej występującymi są inkluzje ubikwitynowe. Ubikwityna przyłącza się do większości białek tworzących agregaty w ALS, dlatego najczęściej stosowanym sposobem uwidaczniania nieprawidłowej akumulacji białek w tej chorobie jest histologiczne badanie immunocytochemiczne z przeciwciałem przeciwko ubikwitynie (Adamek i Tomik, 2005). W skład wtrętów ubikwitynowych w fALS wchodzi najczęściej białko TDP-43 i zmutowane białko SOD1 (Barber i Shaw, 2010). Dodatkowo w skład agregatów zawierających białko SOD1 mogą wchodzić: białko chaperonowe CCS, kwaśne białko włókienkowe (GFAP), neuronalne transportery glutaminianu, Bcl-2, czy białka związane z funkcją proteosomów i chaperonów. Wiadomo, że agregaty białkowe występujące w sALS nie są zbudowane z białka SOD1 i wciąż poszukuje się ich natury (Shaw, 2005). Podobnie

jak w przypadku akumulacji neurofilamentów nie jest znana przyczyna ani rola powstających patologicznych wtrętów;

- g) stan zapalny – obecność nacieków limfocytarnych (Troost i wsp., 1989 i 1990; Kawamata i wsp., 1992) oraz zwiększona aktywność cyklooksygenazy (Cox-2) aktywowanej pod wpływem stanu zapalnego (Almer i wsp., 2001) w rdzeniu kręgowym, a także obecność cytokin i chemokin (takich jak np. interleukina-6, czynnik martwicy guza (TNF- α), transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1)) w płynie mózgowo-rdzeniowym, osoczu krwi i naskórku (Shaw, 2005; Cozzolino i wsp., 2008) sugeruje toczący się w organizmie pacjentów chorych na ALS przewlekły proces zapalny. Na modelu zwierzęcym wykazano wzrost czynników prozapalnych i aktywację mikrogleju już w bezobjawowej fazie choroby (Shaw, 2005; Cozzolino i wsp., 2008) oraz wysoką immunoreaktywność Cox-2 w neuronach i komórkach glejowych rdzenia kręgowego (Almer i wsp., 2001; Papadimitriou i wsp., 2010);
- h) rola komórek glejowych – ALS określa się jako chorobę degeneracyjną neuronów ruchowych, niemniej coraz więcej jest dowodów na to, że komórki otaczające neurony tzn. mikroglej i astrocyty mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie i rozwoju tej choroby. Po odkryciu podłoża genetycznego ALS (np. związku pomiędzy mutacją SOD1 a fALS) pojawiło się pytanie, dlaczego proces chorobowy dotyczy tylko komórek nerwowych, skoro ekspresja genu obejmuje również inne komórki organizmu. Pierwszego dowodu na to, że niezbędnym czynnikiem w procesie chorobowym jest udział innych typów komórek, dostarczyły badania wykazujące, że ograniczenie ekspresji zmutowanego białka SOD1 tylko do komórek nerwowych (Pramatarova i wsp., 2001; Lino i wsp., 2002) czy gleju (Gong i wsp., 2000) jest niewystarczające dla rozwoju choroby. Dalszych dowodów dostarczyła praca na chimerach zbudowanych z połączenia normalnych, prawidłowych komórek myszy i komórek z ludzkim zmutowanym białkiem SOD1 w ilości

wystarczającej, aby wywołać ALS. Wykazano, że nawet niewielki odsetek „zdrowych” komórek glejowych otaczających motoneurony ze zmutowanym białkiem SOD1 może złagodzić przebieg choroby – neurony te przeżywają dłużej jeżeli otaczają je komórki glejowe bez mutacji SOD1 (Clement i wsp., 2003). Szereg dalszych badań doprowadziło do stwierdzenia, że zmutowane (mSOD1) komórki glejowe przyspieszają progresję ALS (modulują jej przebieg) (Hall i wsp., 1998), natomiast początek choroby ma swoje źródło ściśle w motoneuronach (Boillée i wsp., 2006). Komórki mikrogleju jako determinanty ALS rozważane są również w związku z ich zdolnością do sekrecji czynników troficznych lub toksycznych, co wiąże się m.in. procesami zapalnymi (Shaw, 2005; Papadimitriou i wsp., 2010);

- i) niedobór czynników wzrostu – czynniki wzrostu (VEGF, IGF, MGF, BDNF) odgrywają między innymi rolę neuroprotekcijną w ośrodkowym układzie nerwowym. Ich niedobór jest sugerowany jako jedna ze składowych w patogenezie ALS (podobnie jak w innych chorobach neurodegeneracyjnych). Dotychczas jednak, mimo bogactwa badań dotyczących tego zagadnienia, nie ma jednoznacznej odpowiedzi czy rzeczywiście w ALS występuje niedobór tych związków. Na pewno ich podawanie w przypadku modeli zwierzęcych wpływa korzystnie na wydłużenie przeżywalności motoneuronów (Cozzolino i wsp., 2008). Przykładowo, ograniczoną ekspresję VEGF notowano na modelu ALS u szczura już w okresie poprzedzającym chorobę (Xie i wsp., 2004), ale niski poziom tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym i mniejsza liczba komórek rogu przedniego rdzenia kręgowego zdolnych do jego produkcji są również cechami charakteryzującymi ALS u ludzi począwszy od wczesnych objawów chorobowych (Lambrechts i Carmeliet, 2006). Brak odleżyn u pacjentów chorych na ALS nawet w końcowym etapie choroby skierował badania w stronę analizy skóry. Oprócz istotnych zmian kolagenu, włókien elastycznych i substancji podstawowej, wykazano zwiększoną ekspresję VEGF (Suzuki i wsp., 2009).

Ponadto częstość występowania niektórych haplotypów w genie VEGF jest większa w populacji pacjentów z ALS w stosunku do ludzi zdrowych (Lambrechts i Carmeliet, 2006). Wreszcie, podawanie VEGF myszom i szczurom z mutacją białka SOD1 miało korzystny wpływ na ich motorykę, aktywność i długość życia, zarówno jeśli czynnik ten podawany był w fazie przedobjawowej, jak i objawowej choroby, co również sugeruje jego udział w rozwoju choroby;

- j) nieprawidłowe dojrzewanie RNA – błędne dojrzewanie RNA wzięto pod uwagę jako jeden z czynników patogenetycznych ALS po opublikowaniu wyników wskazujących na związek mutacji w dwóch genach wiążących RNA/DNA z fALS, ale również sALS. Te geny to TARDBP (kodujący TDP-43) (Kabashi i wsp., 2008; Sreedharan i wsp., 2008) oraz ALS6 kodujący FUS (inaczej TLS) (Kwiatkowski i wsp., 2009; Vance i wsp., 2009). Mutacje te powodują przemieszczenie kodowanych przez te geny protein z jądra komórkowego, miejsca ich prawidłowej lokalizacji, do cytoplazmy, gdzie tworzą agregaty (Barber i Shaw, 2010). Rola TDP-43 i FUS nie jest dokładnie poznana, wiadomo jednak, że są one zaangażowane w regulację ekspresji genów czyli transkrypcję, splatanie i transport RNA oraz translację, oba również w konsekwencji łączą się bezpośrednio z RNA oraz DNA. Nie wiadomo jednak, czy patogenetyczne działanie zmutowanego białka jest związane z zyskaniem przez nie nowej toksycznej funkcji, czy przez utratę funkcji prawidłowej (Lagier-Tourenne i Cleveland, 2009).

Podsumowując, postuluje się, że mechanizmy prowadzące do śmierci motoneuronów, niezależnie od etiologii są takie same w fALS i sALS oraz że jest to zjawisko wieloczynnikowe, złożone (obejmujące większość z wymienionych wyżej procesów) i w obecnym stanie wiedzy nie do końca zrozumiałe (Cozzolino i wsp., 2008). Natomiast wyjaśnienie wybiórczej wrażliwości motoneuronów na proces zwyrodnieniowy poszukuje się w ich nieporównywalnie większych rozmiarach w stosunku do innych neuronów, szybszym

metabolizmie, specyficznych cechach mitochondriów, zależności tych komórek od sprawnego transportu wewnątrzkomórkowego, specyfiki powierzchniowych receptorów glutaminianergicznych, dużej ilości transporterów glutaminianu w okolicy wrażliwych grup motoneuronów, niskiej ekspresji specyficznych protein wiążących wapń, wysokiej ekspresji SOD1 oraz wysokiego progu dla ekspresji białek szoku cieplnego (Shaw, 2005; von Lewinski i Keller, 2005; Pun i wsp., 2006; Dadon-Nachum, 2011).

1.1.3. Modele choroby

Zapobieganie czy skuteczne postępowanie lecznicze w odniesieniu do wszystkich chorób, również neurodegeneracyjnych, musi opierać się na gruntownej wiedzy dotyczącej ich czynników sprawczych i mechanizmów patogenetycznych. Prowadzenie badań dotyczących różnych aspektów ALS u ludzi jest bardzo trudne i kosztowne z wielu powodów, m.in. rzadkości występowania, szybkiego przebiegu, dużego rozproszenia, późnego rozpoznania, stosowania różnych form leczenia, a biorąc pod uwagę dużą inwazyjność niektórych badań – wręcz niemożliwe. Jak dotąd dokładny patomechanizm ALS nie został poznany. Z tych względów niezbędne są badania adekwatnego modelu zwierzęcego ALS. Taki model zwierzęcy powinien charakteryzować się dokładnym odwzorowaniem schorzenia występującego u ludzi, zarówno pod względem zmian molekularnych, komórkowych, jak i analogicznych objawów klinicznych.

Badania nad ALS mogą być prowadzone w warunkach *in vitro*, czyli na hodowlach komórkowych i organotypowych wyizolowanych z żywego organizmu oraz *in vivo*, czyli na żywych organizmach w zasadzie bez naruszenia ich stanu.

1.1.3.1. Modele „*in vitro*”

Badania *in vitro* są wygodne, dają możliwość testowania hipotez dotyczących mechanizmów zwyrodnienia motoneuronów oraz szybkiego testowania wybranych strategii leczniczych. Główną wadą takich hodowli jest jednak brak – w przypadku hodowli neuronalnych, lub ograniczenie – w przypadku hodowli organotypowych kory mózgu lub rdzenia kręgowego, interakcji pomiędzy neuronami a innymi typami komórek. Jak wspomniano, takie współzależności międzykomórkowe odgrywają prawdopodobnie bardzo istotną rolę w patogenezie ALS. Ograniczeniem tego typu badań jest również krótka przeżywalność hodowli, wymóg ich pobierania z zarodków lub zwierząt bardzo młodych oraz złożoność identyfikacji i izolacji neuronów ruchowych (Elliott, 1999; Herbig, 2008).

Hodowla organotypowa skrawków rdzenia kręgowego ma w odniesieniu do ALS szereg zalet. Przede wszystkim zachowuje część wspomnianych interakcji międzykomórkowych, skrawki nie tracą normalnej architektury rdzenia, dodatkowo identyfikacja motoneuronów jest łatwa ze względu na ich relatywnie duże rozmiary. Ponieważ liczba motoneuronów w jednym skrawku jest niewielka, istnieje dodatkowo możliwość stworzenia hodowli wzbogaconej w motoneurony. Niestety, interpretując dane z tego typu doświadczeń, trzeba mieć na uwadze, że wycinając skrawki z żywego organizmu doprowadzamy do wielomiejscowej aksotomii pozbawiając motoneurony nie tylko wpływów zstępujących, ale również ich połączeń obwodowych, co może mieć wpływ na przebieg eksperymentu. Ponadto środowisko funkcjonowania motoneuronów w takiej hodowli jest istotnie zmienione i wyniki doświadczeń w dużej mierze zależne są od konkretnych warunków eksperymentalnych (Elliott, 1999; Tovar-Y-Romo i wsp., 2009).

Testuje się również modele hodowli komórkowych hybrydowych, np. w celu zapewnienia trwałości hodowli łączy się komórki neuroblastomy, które charakteryzują się dużą zdolnością do proliferacji, z motoneuronami rdzenia kręgowego pochodzącymi z

hodowli wzbogaconej. Komórki takiej hodowli (linia NSC-34) wykazują wiele cech charakterystycznych dla motoneuronów, jak synteza acetylocholiny czy generowanie potencjału czynnościowego. Linia komórkowa NSC-34 z ekspresją zmutowanego białka SOD1 dodatkowo prezentuje niektóre typowe dla ALS zmiany w motoneuronach i z tego względu jest rozważana jako model ALS oraz służy do badania niektórych mechanizmów toksycznego oddziaływania zmutowanego białka SOD1. Niestety hodowla ta zachowuje równocześnie niektóre cechy komórek neuroblastomy, mogące przesłaniać rzeczywiste podłoże zmian w badaniach nad mechanizmami prowadzącymi do śmierci motoneuronów oraz potencjalnymi czynnikami prewencyjnymi tych procesów (Tovar-Y-Romo i wsp., 2009).

1.1.3.2. Modele „*in vivo*”

Kompleksowość żywego organizmu jest cechą decydującą o tym, że badania nad modelami *in vivo* są najlepszym źródłem wiedzy nie tylko o patogenezie, ale również o skuteczności potencjalnych działań terapeutycznych i prewencyjnych. Modele *in vivo* mają przede wszystkim tę przewagę nad hodowlami komórkowymi czy organotypowymi, że odzwierciedlają bezpośredni związek pomiędzy zmianami na poziomie komórkowym i cechami klinicznymi choroby. W przypadku ALS będzie to np. stopniowe zwyrodnienie motoneuronów i postępujące porażenie mięśni.

Najstarszym modelem stosowanym dla wyjaśnienia procesów patologicznych leżących u podłoża ALS jest model oparty na aksotomii – bezpośrednim uszkodzeniu aksonów motoneuronów w wyniku przecięcia nerwów obwodowych. Jest to model łatwo powtarzalny, wywołujący degenerację motoneuronów o charakterze apoptozy i ostrym przebiegu (około kilku dni). Model ten ma obecnie nikłe zastosowanie w badaniach nad ALS z wielu względów. Przede wszystkim aksotomia prowadzi do jednorazowego, ostrego uszkodzenia aksonów, natomiast w przebiegu ALS zmiany te mają charakter ciągły i

postępujący. Ponadto ALS ujawnia się w większości u osobników dorosłych, natomiast aksonopatię wykonuje się na niedojrzałych osobnikach w okresie neonatalnym. Nie jest wiadome również czy apoptoza motoneuronów odgrywa istotną rolę w rozwoju ALS (Elliott, 1999).

W literaturze opisuje się również modele zwierzęce naturalnie występujące w przyrodzie związane ze spontanicznymi mutacjami w genach. Należą tu:

- a) myszy „chwiejne” (ang. *wobbler mouse*), są najstarszym modelem tego typu. Mutacja w genie *wr* zmapowanym na chromosomie 11 powoduje u tych myszy śmierć ciał komórkowych motoneuronów odcinka szyjnego kręgosłupa. Prowadzi to do proksymalnej aksonopatii, objawiającej się postępującym osłabieniem mięśni kończyn przednich, czego efektem jest chwiejny chód. Objawy pojawiają się około 1. miesiąca życia, a zwierzę umiera mając około 1 rok. Mimo, że znany jest gen ulegający mutacji, mechanizm neurodegeneracji w tym modelu pozostaje niewyjaśniony (Elliott, 1999; Xu i wsp., 2001; Herbig, 2008; Tovar-Y-Romo i wsp., 2009);
- b) myszy *pnm* (ang. *progressive motor neuropathy*), rozwijają objawy osłabienia mięśni kończyn tylnych i obręczy miedniczej (postępująca ogonowo-czaszkowa degeneracja motoneuronów) począwszy od 3. tygodnia życia, a umierają w 7. tygodniu. Zmiany patologiczne rozwijają się w tym modelu inaczej niż w ALS, ponieważ pojawia się obszerna, dystalna aksonopatia, natomiast ciała motoneuronów pozostają relatywnie nietknięte (Elliott, 1999; Tovar-Y-Romo i wsp., 2009). Dlatego model ten odnosi się raczej do polineuropatii, a nie do ALS (Herbig, 2008);
- c) model spontanicznego postępującego osłabienia mięśni *nmd* (ang. *neuromuscular degeneration*). Myszy *nmd* w 2. tygodniu życia rozwijają gwałtownie postępujące osłabienie mięśni, począwszy od kończyn tylnych i rzadko przeżywają ponad 4 tygodnie.

Objawy takie są spowodowane zwyrodnieniem ciał motoneuronów w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego (Cook i wsp., 1995; Elliott, 1999; Herbiak, 2008);

- d) myszy i szczurzy model degeneracji nerwowo-mięśniowej mnd (ang. *motor neuron degeneration*), w którym objawy takie jak sztywność, zanik mięśni i niezborność ruchowa pojawiają się u zwierząt około 5. do 11. miesiąca życia początkowo w kończynach tylnych, ostatecznie doprowadzając do paraliżu czterokończynowego. Czas przeżycia nie przekracza 14 miesięcy (Messer i Flaherty, 1986; Elliott, 1999; Herbiak, 2008). Degeneracja dotyczy neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, jądra podjęzykowego oraz kory mózgu, ale dodatkowo u zwierząt z tego modelu obserwuje się ciężką retinopatię (Elliott, 1999);
- e) myszy z mutacją wst/wst (ang. *wasted mutant mouse*) są traktowane jako model spontanicznej rdzeniowej neurodegeneracji. Objawia się ona paraliżem kończyn tylnych, wynikającym niekoniecznie z utraty motoneuronów, ale ich wakuolizacji (Tovar-Y-Romo i wsp., 2009);
- f) modele ALS naturalnie występujące u większych zwierząt, jak np. psów (Cork i wsp., 1990) czy koni (Cummings i wsp., 1990). Zmiany patologiczne i obraz kliniczny pod wieloma względami podobne są do występujących u ludzi z fALS, natomiast wykorzystanie tych gatunków do badań eksperymentalnych jest z oczywistych względów skomplikowane (Tovar-Y-Romo i wsp., 2009).

Powstanie i rozwój technik transgenizacji zwierząt umożliwiły tworzenie nowych modeli zwierzęcych, opartych na znanych mutacjach genowych będących przyczynami fALS i zdecydowanie lepiej odzwierciedlających chorobę występującą u człowieka aniżeli mutacje spontaniczne, naturalnie występujące w przyrodzie.

Przełomem w rozwoju wiedzy na temat ALS było odkrycie przez Rosena i współpracowników (1993) związku między fALS a mutacją w genie kodującym enzym

SOD1. Dało to również możliwość stworzenia modelu choroby opartego na zmianach w obrębie tego enzymu. Początkowo sądzono, że u podłoża ALS związanego z mutacją białka SOD1 leży jego niedobór lub nadmiar. Szybko okazało się jednak, że wyłączenie u myszy ekspresji (ang. *knock-out*) SOD1 podobnie jak i nadmiar niezmutowanego tzw. dzikiego białka SOD1 nie daje objawów chorobowych typowych dla ALS, a jedynie zaburzenia rozrodu oraz częściową utratę zdolności do regeneracji aksonów (niedobór SOD1) czy łagodne dysfunkcje ruchowe pojawiające się u starych osobników (nadekspresja SOD1) (Elliott, 1999; Grieb, 2005; Herbig, 2008). Dopiero dodanie do genomu gryzoni ludzkiego zmutowanego genu SOD1 (hmSOD1) doprowadziło do wytworzenia modelu zwierzęcego ALS z objawami typowymi dla choroby u ludzi. Pierwszym widocznym objawem postępującej choroby jest u szczurów z mutacją hmSOD1 zmniejszenie spontanicznej dobowej aktywności, następnie rozwija się osłabienie mięśni kończyn tylnych (zwykle asymetrycznie) z równoczesnym spadkiem masy ciała. Rozwój choroby jest więc nieco odmienny jak u ludzi, u których pierwsze objawy pojawiają się najczęściej w kończynach górnych. Cechą charakterystyczną wczesnej fazy choroby zwierząt jest również zwiększone napięcie mięśni ogona. Kolejno paraliż obejmuje obie kończyny tylne, następnie przednie i zwierzę traci zdolność poruszania. Obraz kliniczny choroby jest wynikiem progresywnego spadku liczby neuronów ruchowych rdzenia kręgowego oraz pnia mózgu, rozpoczynającego się jednak wcześniej aniżeli widoczne objawy zewnętrzne. Również histopatologiczne zmiany zbliżone są do występujących u chorych na ALS (Nagai i wsp., 2001).

Przypuszczalnie ponad 100 różnych mutacji w genie SOD1 może odpowiadać za rozwój ALS, jednakże część z nich odkryto i zbadano tylko w pojedynczych rodzinach, dlatego niezbędne są dalsze badania. Znaczenie patogenetyczne jedynie 20 spośród nich zostało potwierdzone statystycznie lub w wyniku stworzenia na ich podstawie transgenicznych modeli zwierzęcych. Szeroko stosowane w badaniach nad ALS są

transgeniczne gryzonie z genem SOD1 człowieka i następującymi jego mutacjami: G37R, H46R, L84V, G85R, G86R, D90A, G93A, G93R, G127X (Andersen, 2006b). Najczęściej wykorzystuje się obecnie transgeniczne gryzonie z hmSOD1 i mutacją H46R (substytucja histydyny w miejsce argininy w pozycji 46) oraz G93A (substytucja glicyny w miejsce alaniny w pozycji 93) (Herbik, 2008).

Należy jednak pamiętać, że jakkolwiek modele zwierzęce odzwierciedlają ludzką chorobę zdecydowanie lepiej niż modele „*in vitro*” pozostają jednak tylko modelami i mają swoje ograniczenia. Przede wszystkim zwierzęca anatomia, fizjologia, genetyka i długość życia są inne niż u ludzi. Poza tym w większości modeli transgenicznych, opartych na zmutowanym białku SOD1 człowieka, aby wywołać objawy niezbędna jest nadekspresja SOD1 w stosunku do poziomu występującego u pacjentów (często nawet 10–30 razy więcej zmutowanego białka niż u ludzi jest niezbędne, aby wywołać patologiczny fenotyp). Zupełnie inaczej również planuje się eksperymenty na zwierzętach, a inaczej prowadzi badania na ludziach. Różnice te prawdopodobnie decydują o tym, że tylko kilka metod leczenia farmakologicznego skutecznych u zwierząt z ALS wprowadzono do badań na ludziach, a jeszcze mniej okazało się skutecznymi (Andersen, 2006b; Van Den Bosch i Robberecht, 2006).

Mimo powyższych ograniczeń modele zwierzęce dają możliwość badania przebiegu choroby od jej wczesnego stadium, często jeszcze przed pojawieniem się pierwszych widocznych objawów klinicznych, również z wykorzystaniem bardzo inwazyjnych metod. Tego typu analizy u człowieka nie są możliwe (Grieb, 2004). Równocześnie transgeniczne modele ALS pozwalają na wstępną, przedkliniczną ocenę skuteczności farmakoterapii, u ludzi niemożliwą do przeprowadzenia na dostatecznie dużej grupie badawczej z powodu małej częstości występowania choroby i dużego terytorialnego rozproszenia pacjentów (Grieb, 2004 i 2005).

1.2. Jednostki motoryczne (ruchowe)

1.2.1. Definicja i podział jednostek motorycznych

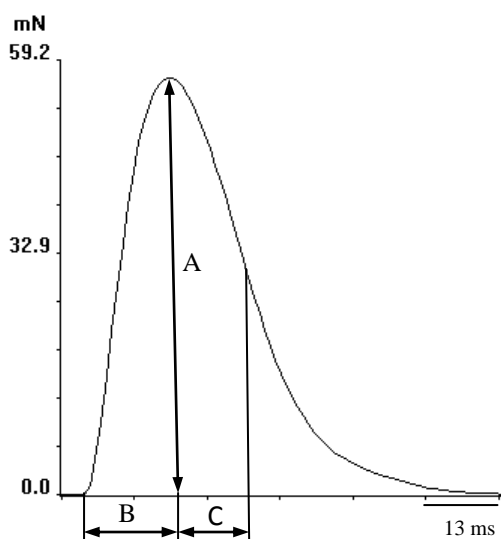
Każdy ruch wiąże się z pracą mięśni, a każdy skurcz mięśnia ssaków wiąże się z aktywnością określonej liczby jednostek ruchowych, które są najmniejszymi jednostkami czynnościowymi występującymi w mięśniu. Termin „jednostka ruchowa” został użyty po raz pierwszy przez Sherringtona, który określił ją jako akson α -motoneuronu i unerwiane przez ten akson włókna mięśniowe (Sherrington, 1906). Obecnie za jednostkę motoryczną (ruchową) uznaje się kompleks w skład którego wchodzi motoneuron i włókna mięśniowe unerwione wyłącznie przez ten motoneuron. Wszystkie włókna mięśniowe jednej jednostki ruchowej (unerwione przez jeden motoneuron) są tego samego typu, mają takie same cechy i reagują równocześnie na dochodzące do nich pobudzenia (Burke, 1981; Burke i wsp., 1973; Grottel i Celichowski, 2000; Celichowski, 2006).

Włókna mięśniowe dzieli się na trzy podstawowe typy różniące się czasem skurczu, odpornością na zmęczenie oraz metabolizmem, tj. włókna: typu SO (ang. *slow oxidative*), typu FOG (ang. *fast oxidative-glycolitic*) i typu FG (ang. *fast glycolitic*). Typ SO to włókna wolno kurczące się, charakteryzujące się metabolizmem tlenowym, typ FOG to włókna szybko kurczące się, odporne na zmęczenie z metabolizmem tlenowo-glikolitycznym, typ FG to włókna glikolityczne, szybkie i podatne na zmęczenie (Stein i Padykula, 1962; Peter i wsp., 1972). W 1973 roku Burke i współpracownicy wprowadzili podział jednostek ruchowych na trzy typy odpowiadające trzem typom włókien mięśniowych, tj. S (wolne, ang. *slow*), w skład których wchodzi włókna mięśniowe typu SO, FR (szybkie odporne na zmęczenie, ang. *fast resistant*), z włóknami mięśniowymi typu FOG i FF (szybkie męczące się, ang. *fast fatigable*), z włóknami mięśniowymi typu FG.

1.2.2. Cechy jednostek motorycznych

Ponieważ jednostka ruchowa zbudowana jest z włókien mięśniowych tego samego typu, a poszczególne typy włókien mięśniowych różnią się od siebie, w związku z tym również cechy trzech typów jednostek motorycznych są różne. Burke i wsp. (1973) dzieląc jednostki ruchowe wzięli pod uwagę dwie ich cechy: objaw ugięcia i wskaźnik zmęczenia.

Objaw ugięcia (ang. *sag effect*), czyli przejściowy spadek siły w trakcie skurczu tężcowego niezupełnego, jest charakterystyczną cechą występującą tylko w skurczach tężcowych jednostek szybkich (zarówno FF jak i FR). W zapisach skurczów tężcowych niezupełnych jednostek wolnych objaw ten nie występuje, dlatego w fizjologicznych doświadczeniach cecha ta dzieli pulę jednostek motorycznych na szybkie i wolne. Należy tu podkreślić, że określenie „skurcz jednostki ruchowej” jest skrótem myślowym, w rzeczywistości kurczą się tylko włókna mięśniowe, a więc składowa obwodowa jednostki motorycznej.



Rys. 1. Przykładowy zapis skurczu pojedynczego jednostki ruchowej typu FF i podstawowe badane cechy: A – siła skurczu, B – czas skurczu, C – czas połowicznego rozkurczu.

Alternatywną metodą podziału jednostek ruchowych na szybkie lub wolne jest klasyfikacja w oparciu o ich czas skurczu pojedynczego. Skurcz pojedynczy jest odpowiedzią jednostki na jeden impuls. Jego czas (ang. *contraction time*) jest mierzony od początku skurczu do punktu, w którym siła skurczu osiąga wartość maksymalną (rys. 1). Jednostki ruchowe wolne charakteryzują się długim czasem skurczu pojedynczego, a szybkie krótkim (u szczura dla mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki z wartością graniczną około 20 ms). Zawsze bowiem należy odnosić ten parametr do włókien mięśniowych konkretnego mięśnia u badanego gatunku, gdyż czas ten określany dla skurczu pojedynczego w obrębie tego samego mięśnia jest dłuższy dla wolnych i krótszy dla szybkich jednostek ruchowych, ale wartość graniczna jest zróżnicowana dla różnych mięśni (Kernell i wsp., 1975; Reinking i wsp., 1975; Goslow i wsp., 1977; Grottel i Celichowski, 1990; Mrówczyński i wsp., 2006).

Tab. 1. Kryteria podziału jednostek ruchowych na trzy podstawowe typy stosowane w warunkach doświadczalnych (wg Celichowski, 2006).

Typ jednostki	S	FR	FF
Objaw ugięcia w skurczu tężcowym niezupełnym	brak	występuje	występuje
Wskaźnik zmęczenia	> 0,5	> 0,5	< 0,5

Wskaźnik zmęczenia (ang. *fatigue index*) jednostki ruchowej jest cechą pozwalającą określić jej odporność na zmęczenie. Odporność taką bada się przeprowadzając tzw. test zmęczenia. Polega on na stymulowaniu jednostki przez kilka minut w taki sposób, aby co sekundę wywoływać skurcz tężcowy niezupełny (stymulacja 14 bodźcami o częstotliwości 40 Hz) (Burke i wsp., 1973). Pozwala to na obserwację, w jaki sposób zmienia się siła generowana przez jednostkę ruchową oraz na wyznaczenie wskaźnika zmęczenia, który jest stosunkiem siły generowanej przez włókna mięśniowe po 2 minutach testu zmęczenia do siły maksymalnej, rozwijanej początkowo (Burke i wsp., 1973). Dla jednostek FF ma on wartość

poniżej 0,5, a dla jednostek FR powyżej 0,5, czyli umożliwia wyróżnienie spośród jednostek szybkich dwóch typów: FF i FR. Dla jednostek wolnych wskaźnik zmęczenia przyjmuje wartości bliskie 1 (Kernell i wsp., 1975; Grottel i Celichowski, 1990) (tab. 1).

Kolejnymi cechami charakteryzującymi poszczególne typy jednostek ruchowych są: czas połowicznej relaksacji (ang. *half-relaxation time*), siła skurczu pojedynczego (ang. *twitch force*), siła skurczu tężcowego (ang. *tetanus force*) oraz zdolność do wzmocnienia potężcowego siły (ang. *post-tetanic potentiation*).

Czas połowicznej relaksacji to parametr określający czas jaki upływa od osiągnięcia najwyższej amplitudy siły skurczu do połowy spadku tej amplitudy (rys. 1) (Grottel i Celichowski, 2000). Jest on, podobnie jak czas skurczu, najkrótszy dla jednostek typu FF, a najdłuższy dla jednostek typu S (Burke i wsp., 1973; Grottel i Celichowski, 1990; Grottel i wsp., 1993). Wzmocnienie potężcowe skurczu pojedynczego jest cechą, która u zwierząt zdrowych dodatkowo pomaga rozróżnić jednostki motoryczne szybkie i wolne. Jednostki szybkie wzmocniają swą siłę po poprzedzającej aktywności, natomiast jednostki wolne nie mają takiej zdolności.

Siła skurczu jednostki ruchowej jest uwarunkowana przede wszystkim liczbą włókien mięśniowych tworzących daną jednostkę. Liczba włókien mięśniowych unerwianych przez jeden motoneuron określana jest jako tzw. wskaźnik unerwienia (Bodine i wsp., 1987; Chamberlain i Lewis, 1989; Kanda i Hashizume, 1992). W skład jednostek S wchodzi najmniejsza liczba włókien mięśniowych (najniższy wskaźnik unerwienia) - stąd ich najniższa siła. Jednostki ruchowe typu FF zbudowane są z największej liczby włókien mięśniowych (najwyższy wskaźnik unerwienia) i ich siła jest najwyższa. W mniejszym stopniu na siłę jednostki ma także wpływ średnica włókien mięśniowych. W związku z tym, że włókna wolne są średnio najcieńsze, generują również najniższą siłę. Dodatkowo zmienność sił rozwijanych przez jednostki poszczególnych typów zależy od tzw. siły specyficznej, czyli siły

generowanej przez włókna mięśniowe przypadającej na określone pole przekroju poprzecznego. Ponieważ siła ta jest związana z ilością i cechami białek kurczliwych w różnych włóknach mięśniowych, jest ona wyższa dla włókien szybkich niż dla wolnych.

Cechy włókien mięśniowych tworzących jednostkę ruchową są skorelowane z cechami unerwiającego je motoneuronu. Pozwala to, z jednej strony, na wykorzystywanie w optymalny (zarówno dla motoneuronu jak i włókien mięśniowych) sposób różnych jednostek ruchowych, a z drugiej strony, na wyspecjalizowanie jednostek ruchowych różnych typów do udziału w odmiennych rodzajach aktywności ruchowej.

Różnice morfologiczne motoneuronów budujących odmienne typy jednostek ruchowych to przede wszystkim: wielkość perikarionu, liczba dendrytów oraz grubość aksonu. Motoneurony jednostek FF mają największe ciała komórkowe i największą liczbę wypustek, a motoneurony jednostek S są najmniejsze i mają najmniejszą liczbę dendrytów (Burke, 1981; Grottel i Celichowski, 2000; Celichowski, 2006).

Z wielkością neuronu koreluje jego oporność wejściowa, związana z pobudliwością. Najbardziej pobudliwe są motoneurony jednostek S, charakteryzujące się najwyższą opornością wejściową, a najmniej pobudliwe są motoneurony jednostek FF o najniższej oporności wejściowej. Odpowiada to kolejności rekrutacji jednostek ruchowych do skurczu i decyduje o tym, że jednostki ruchowe typu S są najwcześniej i najczęściej angażowane do ruchu (patrz rozdz. 1.2.3. Regulacja siły skurczu jednostki motorycznej). Różnice pobudliwości motoneuronów jednostek ruchowych różnych typów należy również wiązać z różnicami w odporności włókien mięśniowych na zmęczenie. Jednostki S są najbardziej pobudliwe, w największym stopniu wykorzystywane do skurczów, co pozwala na optymalne wykorzystanie najwyższej odporności na zmęczenie włókien mięśniowych wchodzących w ich skład. Jednostki FF z kolei, jako najsilniejsze i najmniej pobudliwe, angażowane są do

skurczów o bardzo dużej sile, ale krótkotrwałych, co wiąże się z niską odpornością na zmęczenie włókien mięśniowych FG.

Najcieńsze aksony mają motoneurony jednostek ruchowych S, a najgrubsze jednostek ruchowych typu FF. Koreluje to z szybkością przewodzenia potencjałów czynnościowych (najniższą w aksonach o najmniejszej grubości i najwyższą w najgrubszych). Średnica aksonu koreluje także z liczbą tworzonych przez ten akson rozgałęzień. Grubsze aksony oddają więcej kolaterali w obrębie rdzenia kręgowego, oraz więcej odgałęzień w obrębie unerwianego przez nie mięśnia (wyższa liczba włókien mięśniowych unerwianych przez motoneuron) (Burke, 1981; Grottel i Celichowski, 2000).

Oprócz różnic pobudliwości motoneuronów wchodzących w skład jednostek motorycznych różnych typów, drugą ich niezwykle istotną cechą jest zdolność generowania potencjałów czynnościowych z częstotliwością odpowiadającą skurczom tężcowym niepełnym włókien mięśniowych przez nie unerwianych. Włókna mięśniowe wolno kurczące się generują skurcze tężcowe niepełne przy znacznie niższej częstotliwości pobudzania niż włókna mięśniowe szybko kurczące się. Motoneurony jednostek wolnych mają dłuższy czas trwania hiperpolaryzacyjnego potencjału następczego (ang. *AHP*, *afterhyperpolarization time*) niż motoneurony jednostek szybkich (Bakels i Kernell, 1993; Mrówczyński i wsp., 2007). Dzięki temu, niezależnie od typu, jednostki pracują w zakresie skurczów tężcowych niepełnych – optymalnych pod względem kosztów metabolicznych i możliwości sterowania ich siłą (Celichowski i wsp., 2000; Grottel i Celichowski, 2000; Celichowski, 2006).

1.2.3. Regulacja siły skurczu jednostki motorycznej

Regulacja siły, niezbędna dla prawidłowego wykonywania wszystkich aktów ruchowych, możliwa jest na drodze dwóch podstawowych mechanizmów: rekrutacji jednostek ruchowych oraz zmiany częstotliwości wyładowań czynnych motoneuronów.

Cechy jednostek ruchowych warunkują ich funkcję i czas pracy. Jednostki typu FF mają cechy przystosowujące je do pracy trwającej krótko (kilka lub kilkanaście sekund), równocześnie jednak ich siła jest najwyższa. Cechy jednostek typu S sprawiają, że dzięki dużej odporności na zmęczenie i wysokiej efektywności (Celichowski i wsp., 2000) mogą pracować nawet kilka godzin, ale ich siła jest niewielka. Motoneurony budujące jednostki ruchowe poszczególnych typów również mają odmienne cechy. Główną z nich jest pobudliwość, która dla motoneuronów jednostek FF jest najniższa, a dla motoneuronów jednostek S najwyższa. W związku z tym w trakcie większości ruchów jednostki typu S są jako pierwsze włączane do skurczu, następnie jednostki typu FR, a w razie potrzeby generowania bardzo wysokiej siły angażowane są jednostki typu FF. Tak uporządkowane włączanie coraz większej liczby jednostek ruchowych mięśnia do skurczu, powodujące wzrost jego siły, nosi nazwę rekrutacji. Jej kolejność jest zatem ściśle określona i następująca – jednostki ruchowe typu S są rekrutowane jako pierwsze, potem jednostki typu FR i FF jako ostatnie. Proces wyłączenia jednostek ze skurczu, czyli dekrutacja, ma porządek odwrotny – najpierw wyłączane są jednostki FF, potem FR, a na końcu S (Burke, 1981; Celichowski, 2006).

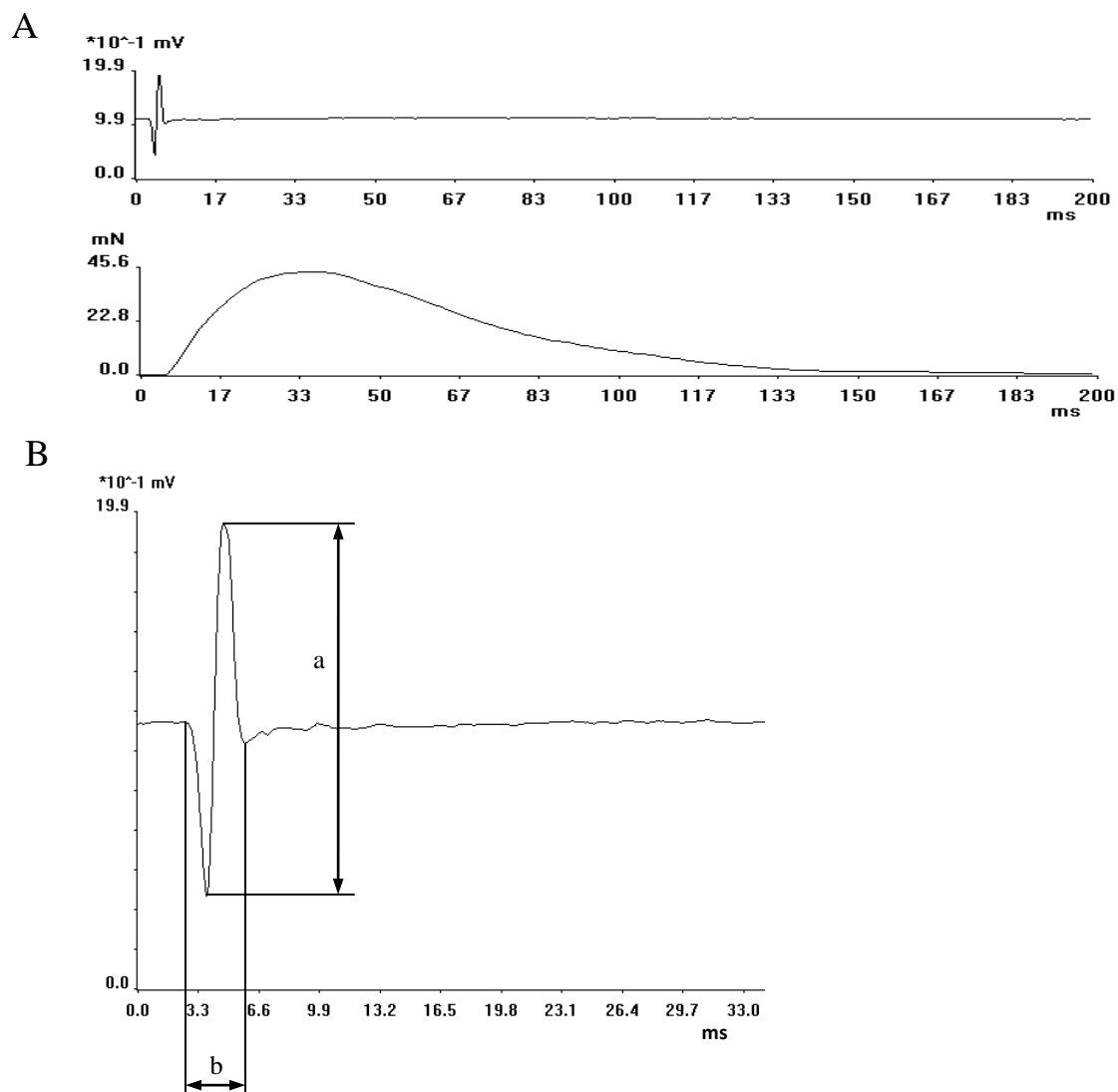
Drugi mechanizm umożliwiający sterowanie siłą skurczu to zmiany częstotliwości wyładowań motoneuronów. W trakcie wykonywania ruchów dowolnych, jednostki pracują w zakresie skurczów tężcowych niezupełnych. Taki rodzaj skurczu jest korzystny z dwóch powodów: jego siła może być regulowana poprzez zmiany częstotliwości dochodzących pobudzeń i może zmieniać się nawet w 3-8-krotnym zakresie (Kernell i wsp., 1983,

Celichowski i Grottel, 1993 i 1997), a równocześnie koszty energetyczne takiego skurczu są dla czynnej jednostki najniższe (Celichowski i wsp., 2000). Regulacja siły skurczu tężcowego może opierać się na chwilowej nawet zmianie częstotliwości i układu impulsów generowanych przez motoneurony. Nawet względnie niewielkie zmiany wywołują znaczną modulację przebiegu siły skurczu (Burke i wsp., 1970; Grottel i Celichowski, 1999; Celichowski i wsp., 2008; Krutki i wsp., 2008c). Przykładem może być znaczący wzrost siły skurczu tężcowego rozpoczynającego się dwoma pobudzeniami, generowanymi w bardzo krótkim odstępie czasu (tzw. dublet), w stosunku do skurczu o takiej samej częstotliwości pobudzeń, ale bez dubletu (Burke i wsp., 1970; Celichowski i Grottel, 1998). Regulacja siły skurczu możliwa jest również poprzez zmianę odstępu (nawet tylko jednego) pomiędzy kolejnymi pobudzeniami. Wydłużenie tego odstępu powoduje spadek siły skurczu, a jego skrócenie wzrost (Grottel i Celichowski, 1999).

1.2.4. Potencjał czynnościowy jednostki motorycznej

Tkanka mięśniowa należy do tkanek pobudliwych, mogących natychmiast reagować na docierające do nich pobudzenie. Błona włókna mięśniowego w spoczynku jest spolaryzowana, co jest wynikiem głównie przewagi jonów potasu wewnątrz komórki i jonów sodu na zewnątrz włókna. Pobudzenie włókna mięśniowego wiąże się zatem z otwieraniem w jego błonie kanałów jonowych i przepływem jonów sodowych oraz potasowych, zgodnie z gradientem stężeń, co wywołuje powstanie pola elektrycznego wokół aktywnego włókna mięśniowego. Umieszczenie w tym polu elektrody rejestrującej pozwala zapisać potencjał czynnościowy włókna mięśniowego. Włókna mięśniowe tworzące jednostkę ruchową, są pobudzane niemal równocześnie przez motoneuron, zatem ich rejestrowane potencjały czynnościowe nakładają się z kilkumilisekundowym rozproszeniem i sumują w potencjał o złożonym niekiedy kształcie. Potencjałem czynnościowym jednostki ruchowej nazywa się

potencjał będący sumą potencjałów wielu włókien jednostki, rejestrowany elektrodą znajdującą się w pobliżu tych włókien. Potencjał taki powstaje wcześniej niż sam skurcz i trwa znacznie krócej w porównaniu z jego przebiegiem (Celichowski, 2006) (rys. 2).



Rys. 2. A – przykład oryginalnego zapisu potencjału czynnościowego jednostki ruchowej oraz skurczu pojedynczego tej jednostki. B – analizowane parametry potencjału czynnościowego jednostek ruchowych: amplituda – a, czas trwania – b.

1.3. Mechanizm reinerwacji obocznej

Reinerwacja oboczna jest bardzo ważnym mechanizmem kompensującym spadek liczby motoneuronów, występującym zarówno w procesie starzenia się organizmu, jak i w warunkach patologicznych (np. uszkodzenie rdzenia kręgowego, uszkodzenie nerwu, choroby neurodegeneracyjne). Niezależnie od przyczyny, czynnikiem inicjującym procesy reinerwacji jest zawsze częściowe odnerwienie mięśnia. W odpowiedzi pozostałe, funkcjonujące motoneurony, zaopatrują (reinerwują) odnerwione włókna mięśniowe, powiększając tym samym rozmiary jednostek ruchowych, które tworzą (Gordon i wsp., 2004). Mechanizm reinerwacji polega na tworzeniu przez motoneuron cienkich wypustek wychodzących z zakończeń aksonu lub przewężeń Ranviera, które docierają do odnerwionych włókien mięśniowych, odbudowując płytkę motoryczną zwykle w miejscu poprzednio istniejącej płytki, w ten sposób je reinerwując. Badania elektrofizjologiczne przeprowadzane na gryzoniach, kotach i ludziach wykazały, że w ten sposób może zostać skompensowana utrata nawet 85% motoneuronów, a pozostałe jednostki ruchowe mogą zwiększać swoje rozmiary nawet 5-8-krotnie (średnio 3-5 razy) (Brown i Ironton, 1978; Fisher i wsp., 1989; Dengler i wsp., 1990; Yang i wsp., 1990; Rafuse i wsp., 1992; Rafuse i Gordon, 1996; Tam i wsp., 2001; Tam i Gordon, 2003). Kluczową rolę w procesie reinerwacji obocznej odgrywają komórki Schwanna, pokrywające włókna nerwowe także wewnątrz mięśnia. Komórki te pomiędzy reinerwującą i odnerwioną synapsą tworzą wypustki na kształt tunelu, wzdłuż których odnogi aksonalne rosną w sposób ukierunkowany. Kiedy obie komórki – odnerwione włókno mięśniowe i reinerwujący akson – połączą się, komórki Schwanna wycofują swoje wypustki (Gordon i wsp., 2004).

1.4. Plastyczność jednostek motorycznych

Jednostki ruchowe są strukturą plastyczną. Większość cech skurczu jednostek ruchowych w wyniku zmian aktywności mięśni może ulegać zmianom adaptacyjnym. Zmiany adaptacyjne mogą nawet prowadzić do transformacji jednostek ruchowych. Adaptacja i transformacja pomiędzy poszczególnymi typami jednostek motorycznych zachodzi zarówno w zdrowym mięśniu, jak i w warunkach patologii. W warunkach fizjologicznych zmiany adaptacyjne włókien mięśniowych mogą być efektem np.: treningu, bezruchu, odciążenia, przeciążenia, procesów starzenia się organizmu, czy mogą powstawać w następstwie elektrycznej stymulacji mięśni. Warto zaznaczyć, że zmiany adaptacyjne obejmują włókna mięśniowe tych jednostek ruchowych, których czynność została zmieniona (Thompson, 1994; Ishihara i wsp., 1998). Procesy patologiczne, zwłaszcza dotyczące układu nerwowo-mięśniowego (jak np.: uszkodzenie rdzenia kręgowego, częściowe odnerwienie mięśnia czy rozmaite procesy chorobowe), również uruchamiają mechanizmy plastyczności jednostek ruchowych, prowadząc do zmian transformacyjnych.

Trening to proces prowadzący do zwiększenia zdolności do wykonywania wysiłków fizycznych. Zdolność ta wzrasta pod wpływem systematycznie powtarzanych wysiłków fizycznych w efekcie zmian adaptacyjnych zachodzących w organizmie. Rozwijające się zmiany dotyczą ultrastrukturalnej, morfologicznej, biochemicznej i czynnościowej charakterystyki organizmu (Kozłowski i Nazar, 1995). Zależnie od charakteru wysiłku fizycznego (trening siły lub wytrzymałości) zmiany pojawiające się w konkretnych układach (mięśniowym, oddechowym, krążenia, nerwowym i innych) są specyficzne i ukierunkowane na to, by aktualnie wykonywana praca realizowana była w sposób optymalny. Zatem ustalając konkretne parametry treningu, takie jak czas trwania i poziom siły, oddziaływać można na określone typy jednostek ruchowych. Przykładowo, poziom siły wiązać należy z procesem rekrutacji jednostek ruchowych, w związku z czym trening, prowadzony na niskim poziomie

siły skurczu prowadzi do zmian adaptacyjnych tylko jednostek S i FR, a gdy w trakcie treningu generowane są bardzo wysokie siły zmiany dotyczą także jednostek FF (Pilaczyńska-Szczeńiak i Celichowski, 2006; Pogrzebna, 2007). W związku z powyższym, trening wytrzymałości o długim czasie trwania, realizowany na niskich poziomach siły i o dużym zapotrzebowaniu tlenowym będzie indukował zmiany we włóknach mięśniowych SO i FOG (w jednostkach ruchowych S i FR). Procesy adaptacyjne tkanki mięśniowej będące efektem tego typu treningu mogą także obejmować wzrost liczby włókien mięśniowych charakteryzujących się metabolizmem tlenowym, w szczególności FOG, zwykle kosztem włókien FG podlegających transformacji (a zatem transformacji jednostek FF w kierunku FR) (Schluter i Fitts, 1994; Waters i wsp., 2004; Pilaczyńska-Szczeńiak i Celichowski, 2006; Pogrzebna, 2007; Röckl i wsp., 2007). Na tak ukierunkowaną transformację wskazuje też obecność włókien mięśniowych hybrydowych (Schluter i Fitts, 1994), czy jednostek ruchowych typu FR, charakteryzujących się kształtem skurczu tężcowego typowym dla jednostek typu FF (Pogrzebna, 2007; Pogrzebna i Celichowski, 2008). Trening siły wywołuje przede wszystkim przerost (wzrost średnicy włókien mięśniowych) głównie włókien szybko kurczących się i wzrost potencjału beztlenowego (Pilaczyńska-Szczeńiak i Celichowski, 2006).

Model funkcjonalnego przeciążenia mięśni wprowadzono w celu określenia granicy plastyczności włókien mięśniowych w odpowiedzi na ich przeciążenie. W tym celu chirurgicznie usuwa się wszystkie mięśnie synergistyczne dla mięśnia badanego, w ten sposób wywołując jego przeciążenie funkcjonalne – tylko badany mięsień wykonuje konkretne zadanie ruchowe. Badania prowadzone na tego typu modelu wykazały, że w szybkim mięśniu (np. podeszwowym) w odpowiedzi na przeciążenie spada proporcjonalny udział jednostek ruchowych szybkich na rzecz pojawienia się jednostek ruchowych „przejściowych” (będących prawdopodobnie jednostkami ruchowymi w trakcie transformacji)

oraz zwiększonego udziału jednostek ruchowych wolnych (Noble i Pettigrew, 1989; Ishihara i wsp., 2003). Obserwacje te potwierdzono badaniami miozyn, w których wykazano, że ekspresja szybkich izoform miozynowych typu IIb i IIx spada, a równocześnie wzrasta ekspresja izoform typu IIa i I (Baldwin i Haddad, 2001). Z kolei badania Olhy i współautorów (1988) na tym samym mięśniu wykazały wzrost proporcjonalnego udziału jednostek typu S i FF oraz równoczesny spadek jednostek typu FR.

Odciążenie mięśni wywołuje przeciwny do przeciążenia kierunek zmian transformacyjnych w obrębie włókien mięśniowych. W wyniku odciążenia kończyny tylnej szczura poprzez podwieszenie za ogon, w mięśniu płaszczkowatym obserwowano transformację jednostek wolnych w kierunku szybkich. Podobne obserwacje poczyniono u ludzi po 2 i 4-miesięcznym okresie całodobowego leżenia w łóżku (ang. *bedrest*) (Leterme i Falempin, 1996; Ohira i wsp., 2000; Baldwin i Haddad, 2001; Ishihara i wsp., 2003; Flück i wsp., 2005). Przetrzymanie szczurów w warunkach pozbawionych działania siły ciężenia (model lotu w kosmos) przez okres 4-16 dni powodowało oprócz zaniku mięśni, spadek ilości miozyn wolnych typu I i wzrost ekspresji miozyn typu IIx. Zmiany takie były silniej zaznaczone w mięśniach wolnych, mających funkcję antygravitacyjną (Baldwin i Haddad, 2001; Ishihara i wsp., 2003).

Zmiany transformacyjne są także charakterystyczną obserwacją w badaniach procesów starzenia się tkanki mięśniowej. W efekcie tych procesów obserwuje się konwersję włókien szybkich w kierunku wolnych (FG do FOG i FOG do SO) oraz zwiększony odsetek włókien typu IIX (prawdopodobnie są to włókna w trakcie transformacji), jak i włókien hybrydowych w porównaniu do osobników młodych (Larsson, 1995). Zatem stopniowo wraz z wiekiem zwiększa się proporcjonalny udział jednostek wolnych (Łochyński, 2006). Warto zaznaczyć również, że w procesie starzenia się organizmu następuje stopniowy ubytek motoneuronów, w wyniku którego część włókien mięśniowych ulega odnerwieniu.

Wspomniane procesy obumierania dotyczą głównie motoneuronów dużych unerwiających włókna mięśniowe typu FG i FOG (Luff, 1998; Łochyński i wsp., 2008).

Technika elektrycznej stymulacji mięśni dała możliwość dokładnej kontroli parametrów i sposobu pobudzania mięśni, a w konsekwencji analizy odpowiedzi włókien mięśniowych na różne typy aktywności. Stwierdzono, że długotrwała stymulacja bodźcami o niskiej częstotliwości (ang. *CLFS, chronic low-frequency stimulation*) wywołuje transformację włókien mięśniowych szybkich w kierunku wolnych u szczura i królika (Pette i wsp., 1992; Martins i wsp., 2006), oraz u kota (Gordon i wsp., 1997; Munson i wsp., 1997).

Odnierwienie mięśnia, w wyniku przecięcia zaopatrującego go nerwu, wyraźnie różni się od innych modeli ograniczających aktywność mięśni, gdyż całkowicie izoluje mięsień od docierających do niego pobudzeń oraz czynników troficznych. Reakcja mięśni na odnerwienie zależy od ich funkcji. W mięśniu płaszczkowatym szczura (mięsień wolny) w wyniku odnerwienia obserwuje się konwersję włókien wolnych w kierunku szybkich, natomiast w mięśniu piszczelowym przednim (mięsień szybki) w kierunku odwrotnym (FG do FOG). W obu tych mięśniach, mimo przeciwnego kierunku zmian transformacyjnych, wzrasta ilość włókien FOG, co może dowodzić, że w odpowiedzi na odnerwienie mięśnie, niezależnie od typu, reagują zwiększoną ekspresją miozyny typu IIa (Huey i Bodine, 1998; Ashley i wsp., 2007).

Całkowite uszkodzenie rdzenia kręgowego prowadzi do zupełnego zniesienia czucia i możliwości ruchu poniżej miejsca uszkodzenia. Zanika napięcie mięśniowe i nie są realizowane skurcze antygravitacyjne. W odniesieniu do włókien mięśniowych tak rozległy uraz wywołuje transformację włókien wolnych w kierunku szybkich (u kota i szczura), a więc kierunek zmian jest zbliżony jak w warunkach odciążenia mięśni (Lieber i wsp., 1986; Baldwin i Haddad, 2001; Celichowski i wsp., 2006; Mrówczyński i wsp., 2010). U ludzi po

uszkodzeniu rdzenia kręgowego transformacja również następuje w tym samym kierunku, ale jej tempo jest zdecydowanie wolniejsze niż u zwierząt (Baldwin i Haddad, 2001).

Zmiany transformacyjne w obrębie włókien mięśniowych pojawiają się również w trakcie rozmaitych chorób i są uwarunkowane specyfiką danej jednostki chorobowej. Przykładowo, u chorych na dystrofię miotoniczną, w mięśniach objętych procesem chorobowym wykazano przewagę włókien mięśniowych typu SO, tym silniej zaznaczoną im bardziej zaawansowany był w danym mięśniu proces chorobowy. Równocześnie notowano spadek proporcjonalnego udziału włókien szybkich. Zmiany te mogą być efektem transformacji włókien typu FOG i FG w kierunku włókien typu SO, ale również preferencyjnego ubytku jednostek ruchowych szybkich (Borg i wsp., 1987). W przypadku skoliozy idiopatycznej obserwowano różnice pomiędzy tymi samymi mięśniami, leżącymi jednak po obu stronach kręgosłupa. W mięśniach przykręgosłupowych po wklęsłej stronie skrzywienia obserwowano transformację włókien wolnych w kierunku szybkich, z obecnością włókien mięśniowych będących w trakcie transformacji (Meier i wsp., 1997).

Podsumowując, należy stwierdzić, że zarówno skład mięśnia, czyli typ i proporcje budujących ten mięsień jednostek motorycznych, jak i cechy samych jednostek ruchowych są uwarunkowane aktywnością mięśnia i jego funkcją. Zmiana czynności mięśnia, niezależnie od czynników sprawczych, prowadzi do zmian adaptacyjnych w obrębie jego włókien mięśniowych i jednostek ruchowych. Transformacja jako efekt daleko idącej adaptacji jednostek ruchowych jest istotnym elementem umożliwiającym plastyczność układu nerwowo-mięśniowego.

2. Cel pracy

Istotnym problemem naukowym w przypadku badań ALS, jest poznanie zmian zachodzących w mięśniach i układzie nerwowym, a w szczególności zmian cech jednostek ruchowych, które stanowią połączenie motoneuronu i włókien mięśniowych, a więc elementów kluczowych dla rozwoju tej choroby. Do tej pory plastyczność jednostek ruchowych w przebiegu ALS opisano tylko wycinkowo, w niewielu publikacjach. Badania te dotyczyły głównie tempa ubytku jednostek ruchowych i oceny zmian ich wielkości wraz z rozwojem choroby, a także cech skurczu w odniesieniu do całego mięśnia (Pun i wsp., 2006; Hegedus i wsp., 2007 i 2008; Gordon i wsp., 2010; Mancuso i wsp., 2011).

Celem pracy jest poznanie na modelu zwierzęcym stwardnienia zanikowego bocznego (szczury transgeniczne SOD1 G93A) zmian zachodzących w jednostkach motorycznych mięśnia oraz ich progresji począwszy od okresu przedobjawowego i w trakcie kolejnych etapów rozwoju dysfunkcji motorycznych. W tym celu postanowiono, przy użyciu metody elektrofizjologicznej, zanalizować: 1) zmiany proporcji jednostek motorycznych poszczególnych typów, 2) cechy skurczu jednostek motorycznych, oraz 3) cechy potencjałów czynnościowych tych jednostek w 3 grupach zwierząt transgenicznych (u zwierząt w okresie bezobjawowym, z pierwszymi objawami i u zwierząt w końcowym okresie choroby) oraz dokonać porównań do grupy kontrolnej. Analiza powyższa pozwoli pośrednio określić również nasilenie i kierunek procesów reinerwacji obocznej w poszczególnych etapach choroby.

Do badań wybrany został mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki. Występują w nim wszystkie 3 typy jednostek motorycznych (FF, FR i S) (Grottel i Celichowski, 1990; Kanda i Hashizume, 1992; Krutki i wsp., 2006). Mięsień ten pełni u szczura funkcję posturalną (jednostki typu S) i bierze również udział w lokomocji (jednostki typu FF i FR). Z tych

powodów może być traktowany jako dobry model do badań cech jednostek ruchowych wszystkich trzech typów, a równocześnie do oceny możliwości adaptacyjnych jednostek ruchowych.

Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wzbogacenia wiedzy na temat procesów patogenetycznych ALS, ich kierunku i nasilenia w kolejnych etapach choroby. Dokładne zobrazowanie zmian cech jednostek motorycznych może dać wskazówki pozwalające jak najdłużej utrzymać sprawności mięśni i niezależność chorych na ALS, tym samym poprawiając ich jakość życia. Równocześnie wyniki badań przyczynią się do oceny możliwości adaptacyjnych układu nerwowo-mięśniowego w warunkach patologii, a także wytyczenia granic plastyczności tego układu.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy prezentowanych doświadczeń stanowiło 18 transgenicznych samców szczurów rasy Sprague-Dawley, nosicielei zmutowanego ludzkiego genu hmSOD1^(G93A), pochodzących z hodowli prowadzonej w Zwierzętarńi Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Kolonia tych zwierząt została tam założona w 2003 roku po udostępnieniu przez firmę Wyeth Co. (USA) hemizygotycznych samców – nosicielei ludzkiego genu SOD1 z mutacją G93A (substytucja glicyny w miejsce alaniny w pozycji 93), wytworzonych przez Howlanda (Howland i wsp., 2002) na bazie szczepu Sprague-Dawley. Zwierzęta przebywały za barierą sanitarną w warunkach SPF (ang. *Specific Pathogen Free*) w środowisku kontrolowanym (temperatura 22±2°C, wilgotność 50-60%), ze stałym dostępem do wody i pokarmu oraz regularnym rytmem dobowym o czasie oświetlenia 13 godzin. Każdy osobnik nowego miotu miał nadawany numer i był oznaczany za pomocą kolczyka, następnie zwierzęta były genotypowane metodą PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) w celu wyselekcjonowania tych, które są nosicielami transgeny (Herbik i wsp., 2006).

Zwierzęta były przekazane do Zakładu Neurobiologii Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu w okresie przedobjawowym (około drugiego, trzeciego miesiąca życia). Po transporcie przebywały w warunkach standardowych (temperatura 20±1°C, pomieszczenie klimatyzowane) z rytmem dobowym 12 godzin/12 godzin, stałym dostępem do wody i pokarmu (mieszanka granulowana „Labofeed”).

Grupę kontrolną stanowiły 3 dorosłe zdrowe samce szczurów rasy Sprague-Dawley. Zwierzęta z grupy kontrolnej przebywały w tych samych warunkach co szczury transgeniczne. Warunki przebywania zwierząt, były zgodne z wymogami prawa polskiego i

Unii Europejskiej, a Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie eksperymentów (zezwozenie nr 17/2007).

3.1.1. Obserwacja stanu zwierząt transgenicznych i podział na grupy badawcze

Zwierzęta transgeniczne po okresie adaptacyjnym trwającym kilka dni były codziennie obserwowane w trakcie naturalnej, swobodnej aktywności, a pojawiające się zaburzenia motoryczne i widoczne objawy chorobowe (jak również ich progresja) były dla każdego zwierzęcia odnotowywane. Te obserwacje pozwoliły na określenie stanu zaawansowania procesu chorobowego zwierząt transgenicznych trzech grup badawczych: grupa ALS I, zwierzęta bez widocznych zaburzeń ruchowych (n=4, wiek 93 ± 8 dni); grupa ALS II, zwierzęta z pierwszymi widocznymi zaburzeniami ruchowymi dotyczącymi jednej lub obu kończyn tylnych (n=4, wiek 129 ± 12 dni); grupa ALS III, w której ograniczenia ruchowe zwierząt były tak duże, że nie mogły się one samodzielnie poruszać, a położone na boku nie potrafiły się samodzielnie odwrócić, z paraliżem kończyn uniemożliwiającym samodzielne pobieranie pokarmu i wody (powiązane z istotną utratą masy ciała i krwawymi wybroczynami wokół oczu) (n=10, wiek 196 ± 18 dni). Do grupy ALS III klasyfikowano zwierzęta w terminalnej fazie choroby, na granicy możliwości przeżycia.

3.2. Anestezja i zabiegi chirurgiczne

Zwierzęta w czasie trwania eksperymentów elektrofizjologicznych były znieczulane za pomocą pentobarbitalu (Morbital, wstępna dawka 60 mg/kg, i.p.). W celu określenia dokładnej dawki wstępnej znieczulenia zwierzęta bezpośrednio przed eksperymentem były ważone. Głębokość znieczulenia była systematycznie sprawdzana w czasie trwania doświadczeń poprzez obserwacje odruchów cofania kończyn i odruchów z małżowiny usznej, a w razie potrzeb znieczulenie było uzupełniane (dawkami 10 mg/kg). Po zakończeniu

eksperymentu szczurom podawana była dawka letalna pentobarbitalu (180 mg/kg), a badany mięsień był pobierany z operowanej kończyny i ważony.

Eksperymenty elektrofizjologiczne były prowadzone na mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki, który wraz z nerwem kulszowym był częściowo wypreparowywany i odseparowywany od otaczających tkanek. Pozostawiano nienaruszony przyczep początkowy, unerwienie badanego oraz zaopatrujące go naczynia krwionośne. Pozostałe mięśnie tylnej kończyny były odnerwiane poprzez przecięcie dochodzących do nich gałązek nerwu kulszowego. Operowana kończyna była unieruchamiana za pomocą stalowego zacisku umieszczanego na kości piszczelowej.

Rdzeń kręgowy był odsłaniany poprzez laminectomię na odcinku kręgosłupa L2-S1 (usunięcie wyrostków kolczystych i łuków kręgow). Z odsłoniętej części rdzenia kręgowego zdejmowana była opona twarda, następnie rdzeń kręgowy oraz korzenie nerwów rdzeniowych były przecinane na poziomie kręgow L1/L2, a nieprzecięte korzenie brzuszne i grzbietowe były odcinane proksymalnie w stosunku do rdzenia kręgowego. Ponad odsłoniętą częścią rdzenia, poprzez podwieszenie skóry grzbietu na metalowej ramce, tworzony był basenik, do którego wlewany był ciepły olej parafinowy, zapobiegający wysychaniu wyizolowanych korzeni nerwów rdzeniowych.

Zwierzę było następnie przenoszone na podgrzewaną płytkę stołu do badań elektrofizjologicznych, gdzie było unieruchamiane metalowymi uchwytami umieszczanymi na wyrostkach kolczystych kręgow Th13 i S2. Badany mięsień poprzez ścięgno Achillesa był przyłączany do miernika siły typu FT-100A, a cała operowana kończyna tylna była zanurzana w ciepłym oleju parafinowym. W czasie eksperymentu mięsień utrzymywano w rozciągnięciu z siłą 100 mN, przy którym jego jednostki ruchowe rozwijają najwyższą siłę skurczu (Celichowski i Grottel, 1992), równocześnie temperatura zwierzęcia i oleju parafinowego

była automatycznie utrzymywana na stałym poziomie ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$) poprzez zastosowanie termoregulatora.

3.3. Czynnościowa izolacja jednostki motorycznej

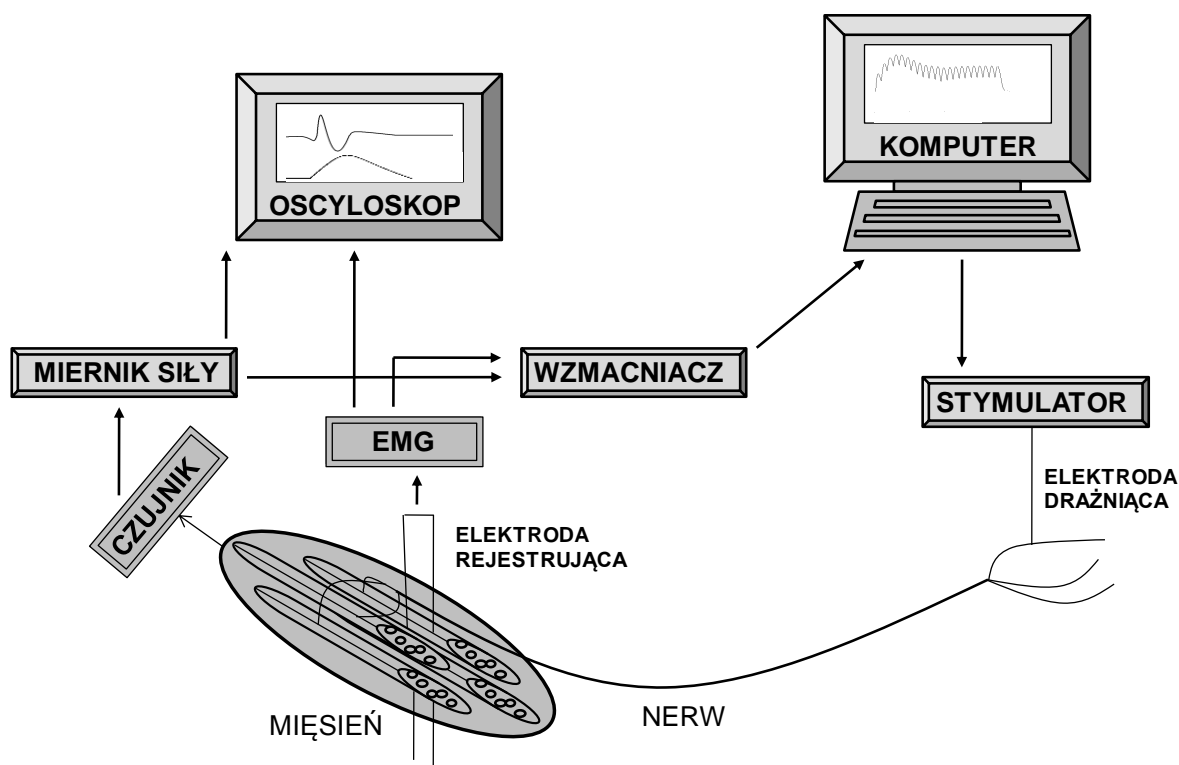
W czasie doświadczeń korzenie brzuszne L4 i L5 dzielone były pod mikroskopem na możliwie jak najmniejsze wiązki aksonów, które następnie nakładano na anodę umieszczoną w oleju parafinowym. Katoda umieszczona była pod warstwą oleju parafinowego, w warstwie soli fizjologicznej. Rozdzielone wiązki aksonów były stymulowane prostokątnymi impulsami elektrycznymi (czas trwania 0,1 ms i amplituda do 0,5 V) w celu pobudzania aksonów jednostek ruchowych w tej wiązce. Ponieważ większość mięśni tylnej kończyny poza badanym była odnerwiona, starano się stworzyć sytuację, gdy wśród pobudzanych aksonów był tylko jeden biegnący do mięśnia brzuchatego przysrodkowego łydki. To stwarzało możliwość funkcjonalnej izolacji jednej jednostki ruchowej. Warunkiem uznania wywołanej aktywności za skurcz jednej jednostki ruchowej był jej charakter „wszystko albo nic” przy stymulacji o wzrastającej amplitudzie, czyli pojedynczy skurcz wszystkich włókien jednostki odbywał się równocześnie i miał charakter niestopniowalny (Kuffler i wsp., 1951; Celichowski, 1992).

W czasie doświadczenia potencjały czynnościowe jednostek motorycznych rejestrowane były za pomocą elektrody dwubiegunowej, wykonanej z drutów srebrnych o średnicy 500 μm , wklutej prostopadle do osi długiej badanego mięśnia, oddalonych od siebie o około 7 mm. Elektrode uziemiającą umieszczono w mięśniach drugiej kończyny.

3.4. Wzorce stymulacji

Protokół doświadczenia składał się kilku wzorców stymulacji, które ułożono z wykorzystaniem komputera z przetwornikiem analogowo-cyfrowym (RTI-800 Utilities) oraz

programu komputerowego Analog 10. Program ten pozwala dowolnie organizować wzorzec pobudzeń i równocześnie steruje stymulatorem (Grass S88). Wszystkie jednostki ruchowe drażnione były według tego samego, zaprogramowanego przed doświadczeniem protokołu. Rejestrowana siła skurczu jednostek ruchowych oraz ich potencjały czynnościowe były zapisywane na twardym dysku komputera (częstotliwość próbkowania 1 kHz dla zapisów sił i 10 kHz dla zapisów potencjałów czynnościowych). W czasie trwania eksperymentu zapisy sił skurczu oraz potencjały czynnościowe były kontrolnie obserwowane na ekranie oscyloskopu (Tektronix TDS 224). Schemat układu badawczo-pomiarowego przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Schemat układu badawczo-pomiarowego.

Protokół drażnienia rozdzielonych korzeni brzusznych w przypadku wszystkich doświadczeń wyglądał następująco: (1) 5 impulsów o częstotliwości 1 Hz (rejestrowano uśredniony skurcz pojedynczy); (2) ciąg impulsów o częstotliwości 40 Hz i czasie trwania

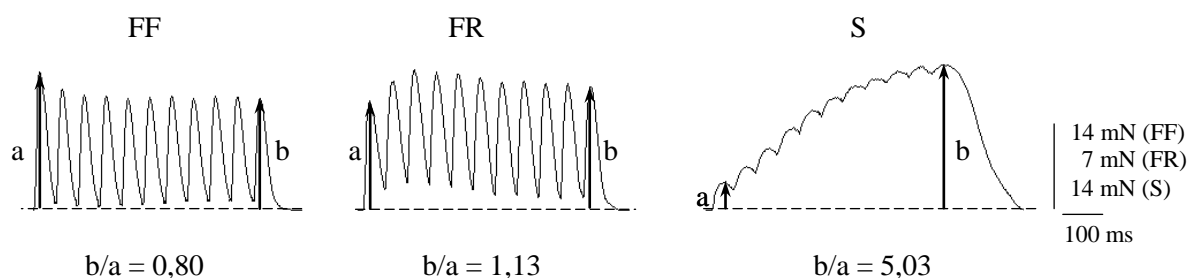
500 ms (rejestrowano skurcz tężcowy niezupełny); (3) ciąg impulsów o częstotliwości 150 Hz i czasie trwania 200 ms (rejestrowano skurcz tężcowy zupełny); (4) 9 ciągów impulsów o czasie trwania 500 ms i kolejno następujących częstotliwościach: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100 i 150 Hz, wywoływanych z 10-sekundowymi przerwami (rejestrowano cykl skurczów tężcowych o stopniowo wzrastającej częstotliwości); (5) 5 impulsów o częstotliwości 1 Hz (rejestrowano uśredniony skurcz pojedynczy); (6) standardowy test zmęczenia (ciągi 14 impulsów o częstotliwości 40 Hz, powtarzane co 1 s przez 3 min) (Burke i wsp., 1973). Kolejne etapy stosowanego protokołu stymulacji rozdzielone były 10-sekundowymi przerwami.

Przedstawiony powyżej protokół stymulacji został ułożony w taki sposób, aby uzyskać pełną charakterystykę parametrów różnych typów skurczów jednostek motorycznych i jednocześnie pozwalał na rejestrację potencjałów czynnościowych tych jednostek. Dzięki temu możliwe było równoczesne rejestrowanie przebiegu skurczów jednostki i towarzyszących im potencjałów czynnościowych.

3.5. Badane parametry skurczu jednostek motorycznych

Analizowane były następujące parametry skurczów jednostek motorycznych: (1) czas skurczu pojedynczego (CT, ang. *contraction time*), mierzony od początku zapisu skurczu pojedynczego do momentu osiągnięcia maksymalnej wartości siły skurczu; (2) czas połowicznego rozkurczu (HRT, ang. *half-relaxation time*) mierzony od momentu osiągnięcia maksymalnej siły skurczu pojedynczego, do momentu w którym siła tego skurczu osiągnie połowę maksymalnej wartości; (3) siła skurczu pojedynczego (TwF, ang. *twitch force*), mierzona od poziomu linii izoelektrycznej do maksymalnego wychylenia zapisu; (4) siła skurczu tężcowego zupełnego (TetF, ang. *tetanus force*) przy stymulacji o częstotliwości 150 Hz, mierzona od poziomu linii izoelektrycznej do maksymalnego wychylenia zapisu; (5)

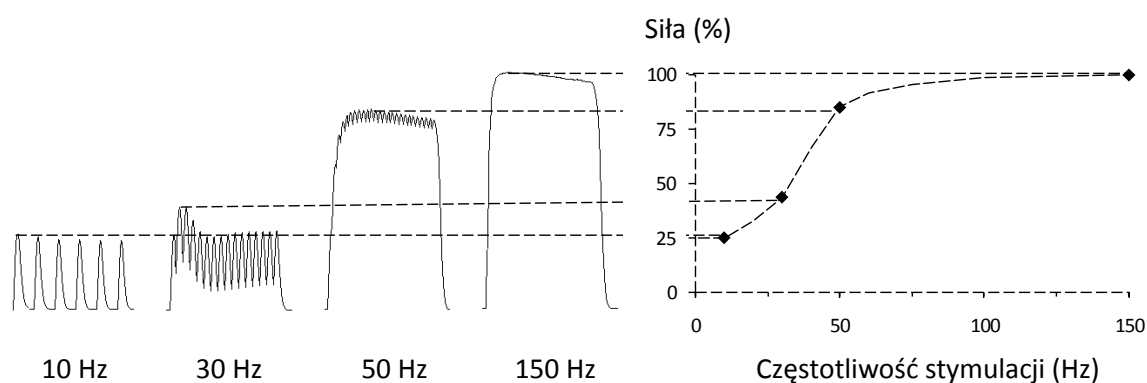
stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego (Tw/Tet , ang. *twitch-to-tetanus ratio*); (6) wartość wzmocnienia potężcowego (PTP, ang. *post-tetanic potentiation*), mierzona jako stosunek siły skurczu pojedynczego rejestrowanego po serii skurczów tężcowych (5. punkt protokołu stymulacji) do siły skurczu pojedynczego rejestrowanego na początku wzorca stymulacji (1. punkt protokołu stymulacji); (7) występowanie objawu ugięcia, czyli przejściowego spadku siły skurczu tężcowego niepełnego przy częstotliwościach stymulacji 20, 30, 40 Hz (Burke i wsp., 1973; Grottel i Celichowski, 1990). Dla każdej jednostki ruchowej, na podstawie przebiegu testu zmęczenia, obliczany był wskaźnik zmęczenia (FatI, ang. *fatigue index*), będący stosunkiem siły skurczu tężcowego niepełnego po dwóch minutach od momentu osiągnięcia najwyższej wartości siły skurczu na początku testu do tej najwyższej wartości (Burke i wsp., 1973; Kernell i wsp., 1975; Grottel i Celichowski, 1999).



Rys. 4. Typowy przebieg skurczu tężcowego niepełnego trzech typów jednostek motorycznych (FF, FR i S) przy częstotliwości stymulacji 20 Hz oraz sposób obliczania indeksu 20 Hz (b/a) dla wszystkich trzech typów jednostek.

Jednostki ruchowe były dzielone na szybkie i wolne na podstawie wartości indeksu 20 Hz (Krutki i wsp., 2008a), który jest stosunkiem wartości odpowiedzi na ostatni impuls w skurczu tężcowym przy częstotliwości 20 Hz do odpowiedzi na pierwszy impuls w tym skurczu. Sposób jego obliczania przedstawiono na rys. 4. Za jednostki wolne (S) uznawano

te, dla których wartość indeksu 20 Hz przekroczyła 2,0, natomiast za jednostki szybkie te, dla których wartość tego indeksu była mniejsza niż 2,0. Dodatkowo, wśród jednostek szybkich, zależnie od wartości wskaźnika zmęczenia, wyróżniane były jednostki szybko kurczące się, odporne na zmęczenie (FR) oraz szybko kurczące się, nieodporne na zmęczenie (FF). Wskaźnik zmęczenia dla jednostek typu FR przyjmuje wartości powyżej 0,5, natomiast dla jednostek typu FF poniżej 0,5 (Kernell i wsp., 1975).



Rys. 5. Sposób wykreślenia krzywej siła-częstotliwość (wg Grottel i Celichowski, 2000).

Opis w tekście.

Badano również zależność siły skurczu jednostek ruchowych od częstotliwości pobudzeń. Wyniki pomiarów siły skurczu przy różnych częstotliwościach pobudzeń przedstawiano w postaci krzywej zależności siły od częstotliwości drażnienia (krzywej siła-częstotliwość). Początek krzywej przedstawia siłę skurczu pojedynczego jednostki, środkowy, stromy zakres tej krzywej odpowiada zakresowi sił rozwijanych przez jednostkę motoryczną w trakcie skurczów tępcowych niepełnych, natomiast stała wartość osiągnięta na końcu zakresu to maksymalna siła danej jednostki, odpowiadająca jej skurczom tępcowym pełnym. Wartości sił skurczu rozwijane przy odpowiednich częstotliwościach drażnienia przedstawiane są na krzywej jako wartości procentowe w odniesieniu do skurczu tępcowego maksymalnego jednostki, traktowanego jako 100% (rys. 5). Obliczano nachylenie najbardziej

stromej części wykresu występujące na wysokości wartości 60% siły maksymalnej, które określa zdolność włókien mięśniowych jednostki motorycznej do zwiększania siły skurczu tężcowego niezupełnego w odpowiedzi na wzrost częstotliwości drażnienia o 1 Hz. Ponadto obliczano częstotliwość stymulacji odpowiadającej na wykresie sile skurczu wynoszącej 60% maksymalnej siły jednostki ruchowej. Przebieg krzywej siła-częstotliwość zależy od parametrów czasowych skurczu pojedynczej jednostki ruchowej (Kernell i wsp., 1983; Celichowski i Grottel, 1997; Mrówczyński i wsp., 2006), dlatego jej sigmoidalny kształt różni się nieco dla poszczególnych typów jednostek i koreluje z wartościami czasu skurczu. Korelację tę obliczano również dla 4 badanych populacji jednostek ruchowych.

W terminalnym stadium choroby (grupa ALS III) u każdego badanego zwierzęcia w mięśni brzuchatym przyśrodkowym łydki kontrolowana była liczba pozostających jednostek ruchowych. W tym celu nerw kulszowy był stymulowany impulsami prostokątnymi o wzrastającym napięciu. W odpowiedzi siła skurczu mięśnia wzrastała skokowo, a każdy wzrost (skok) odpowiadał pobudzeniu kolejnej jednostki ruchowej (McComas, 1991). U pozostałych grup zwierząt, ze względu na większą liczbę jednostek, procedura ta pozostawiała wątpliwości interpretacyjne zapisu, gdyż progi pobudliwości części jednostek były bardzo zbliżone.

3.6. Badane parametry potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych

Dla każdej jednostki ruchowej analizowane były następujące parametry potencjałów czynnościowych poprzedzających skurcz pojedynczy rejestrowany na początku wzorca stymulacji: (1) latencja, czas mierzony od momentu pobudzenia rozdzielonych korzeni brzusznych do pojawienia się potencjału czynnościowego; (2) amplituda, mierzona od minimalnego do maksymalnego wychylenia zapisu potencjału czynnościowego; (3) czas trwania, mierzony od początku do końca aktywności elektrycznej jednostki; (4) czas między

skrajnymi wychyleniami zapisu, mierzony pomiędzy maksymalnym a minimalnym wychyleniem zapisu potencjału czynnościowego; (5) liczba faz, definiowana jako liczba przejść (skrzyżowań) linii zapisu potencjału przez linię izoelektryczną plus jeden oraz (6) liczba zwrotów, czyli zmian kierunku potencjału o różnicy co najmniej 50 μV (Stålberg i wsp., 1986; Krutki i wsp., 2008b).

3.7. Analiza statystyczna

W celu porównania poszczególnych grup badawczych przeprowadzono analizę statystyczną zmian wszystkich mierzonych parametrów przy użyciu testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Analiza statystyczna proporcji poszczególnych typów jednostek ruchowych w badanych grupach przeprowadzona została z wykorzystaniem testu U dla dwóch składników struktury, a zmiany masy ciała szczurów analizowano z wykorzystaniem testu Levene'a jednorodności wariancji. W celu analizy zależności pomiędzy czasem skurczu a częstotliwością stymulacji, przy której generowane jest 60% siły maksymalnej obliczono równania regresji liniowej, współczynnik korelacji porządku rang Spearmana oraz oceniano jego istotność. Różnice uznawano za istotne przy $p < 0,01$ - ** oraz $p < 0,05$ - *. Wyniki przedstawiano w postaci wartości średnich dla poszczególnych grup ($\pm\text{SD}$), a w tabelach zaznaczono dodatkowo wartości minimalne i maksymalne.

4. Wyniki

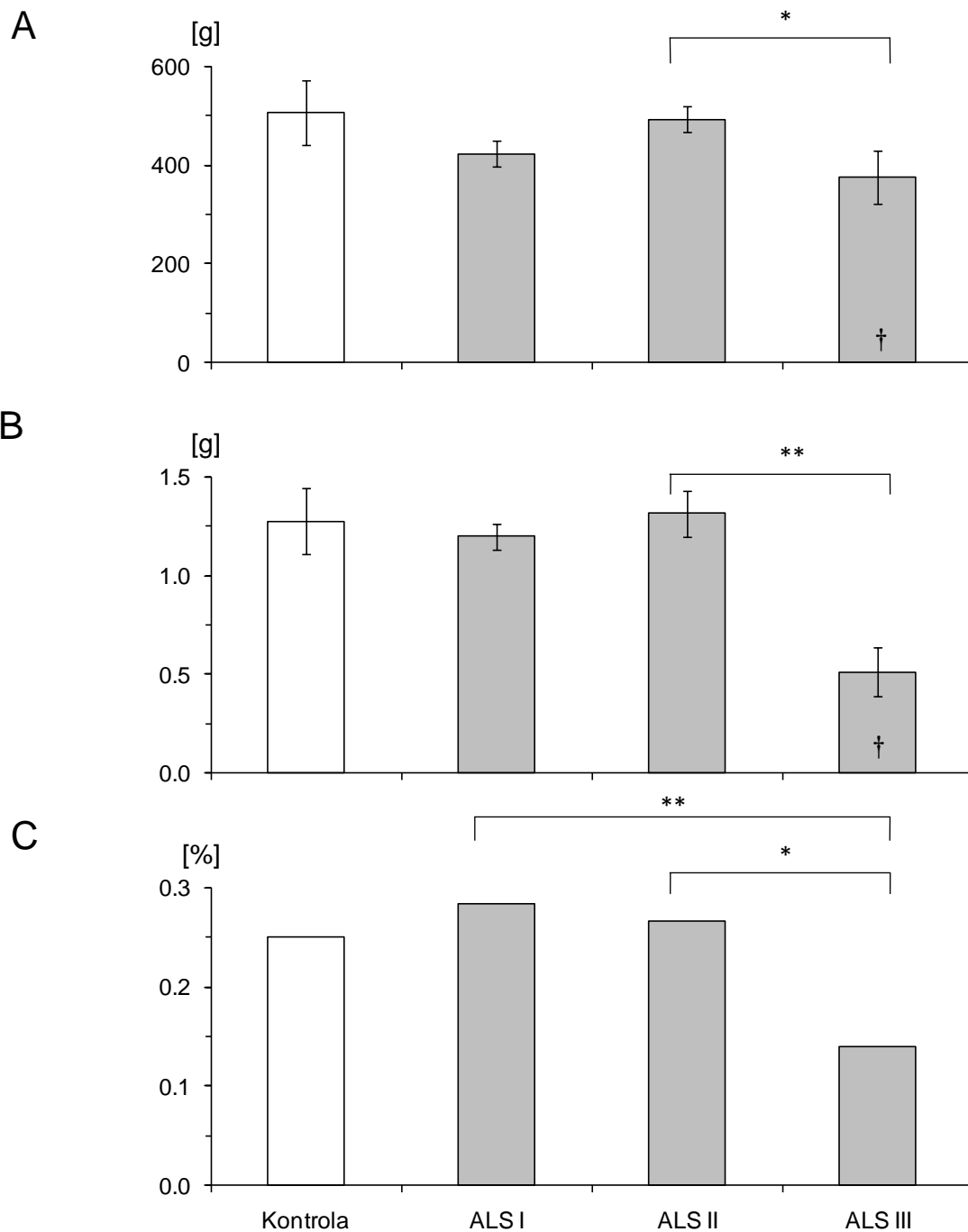
4.1. Zmiany masy ciała i rozwój atrofii badanego mięśnia

Średnie masy ciała szczurów transgenicznych w grupie ALS III były niższe w porównaniu do średniej masy ciała zwierząt z grupy kontrolnej oraz grup ALS I i ALS II. Różnica wynosiła ponad 100 g w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ($p < 0,05$), a masa ciała zwierząt z tej grupy była także istotnie mniejsza niż w grupie ALS II ($p < 0,05$) (rys. 6A).

Masa mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki w grupach ALS I i ALS II nie różniła się istotnie, natomiast była u zwierząt z grupy ALS III znacząco niższa w porównaniu do zwierząt kontrolnych (średnio o około 700 mg) ($p < 0,05$) oraz do grupy ALS II ($p < 0,01$) (rys. 6B). Stosunek masy badanego mięśnia do masy ciała zwierzęcia w grupach ALS I i ALS II wynosił odpowiednio 0,28% i 0,27% i nie różnił się istotnie od kontroli (0,25%), ale w grupie terminalnej wynosił 0,14% (różnica istotna w porównaniu do grup ALS I ($p < 0,01$) i ALS II ($p < 0,05$)) (rys. 6C).

4.2. Liczba jednostek motorycznych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki w końcowym stadium choroby

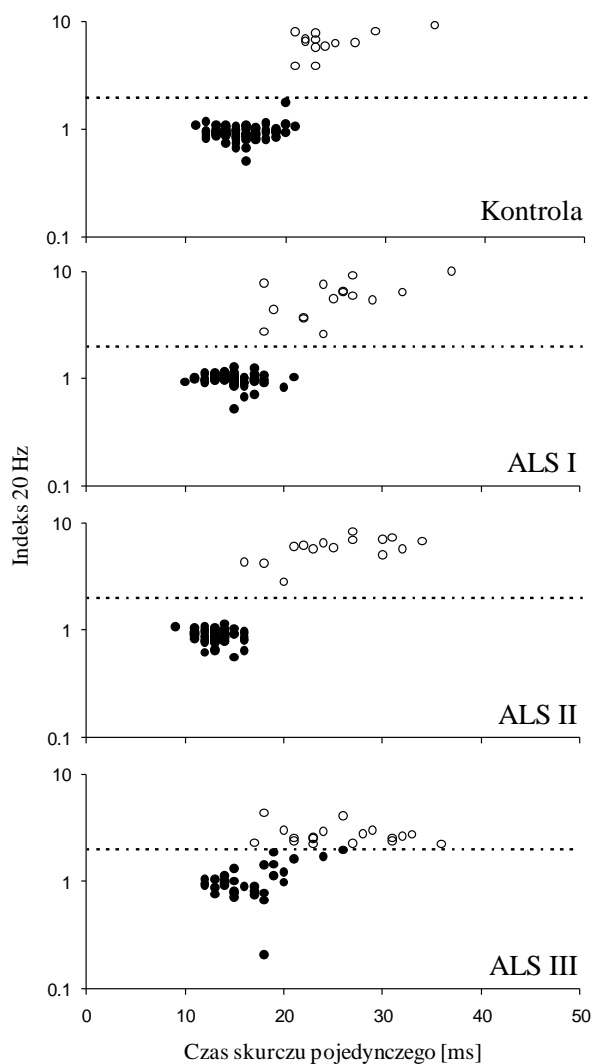
W końcowym stadium choroby (ALS III) u każdego badanego zwierzęcia kontrolowana była liczba jednostek ruchowych pozostających w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki. Zastosowana metoda wykazała, że w momencie pomiaru w badanym mięśniu występowało średnio $6,0 \pm 5,7$ (1-21) jednostek motorycznych.



Rys. 6. Masa ciała (A) i masa mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki (B) zwierząt kontrolnych i transgenicznych w badanych etapach choroby (ALS I, ALS II i ALS III) oraz procentowy stosunek masy badanego mięśnia do masy ciała zwierząt (C). ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ - poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, † - $p < 0,05$ - poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (test Levene'a jednorodności wariancji).

4.3. Klasyfikacja i proporcje jednostek motorycznych

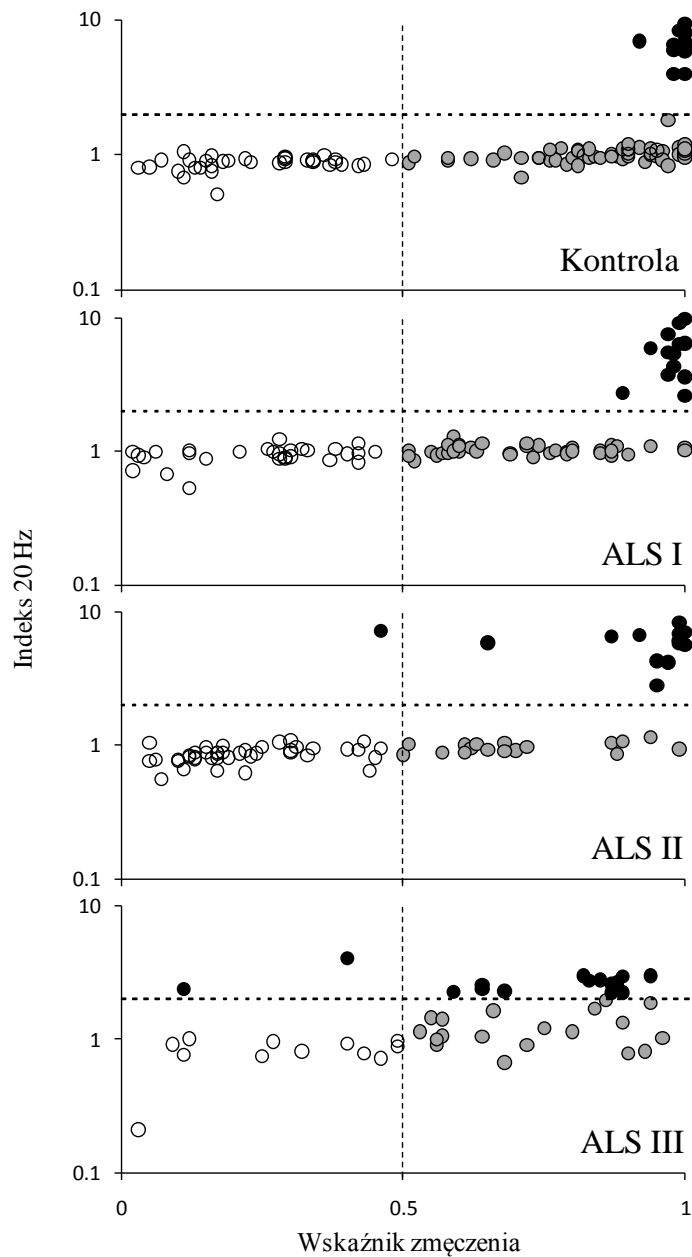
W doświadczeniach zostały przebadane cechy 314 jednostek ruchowych, w tym 105 jednostek w grupie kontrolnej, a pozostałe 209 u zwierząt transgenicznych w poszczególnych grupach, odpowiednio: ALS I – 84 jednostki, ALS II – 75 jednostek, ALS III – 50 jednostek.



Rys. 7. Podział jednostek ruchowych na szybkie (czarne symbole) i wolne (białe symbole) na podstawie indeksu 20 Hz. Wartości indeksu 20 Hz przedstawiono na osi logarytmicznej w funkcji czasu skurczu pojedynczego. Wykres górny - kontrola, poniżej poszczególne grupy zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). Pozioma przerywana linia wyznacza wartość 2,0 indeksu 20 Hz, która jest wartością graniczną dla podziału jednostek motorycznych na szybkie i wolne.

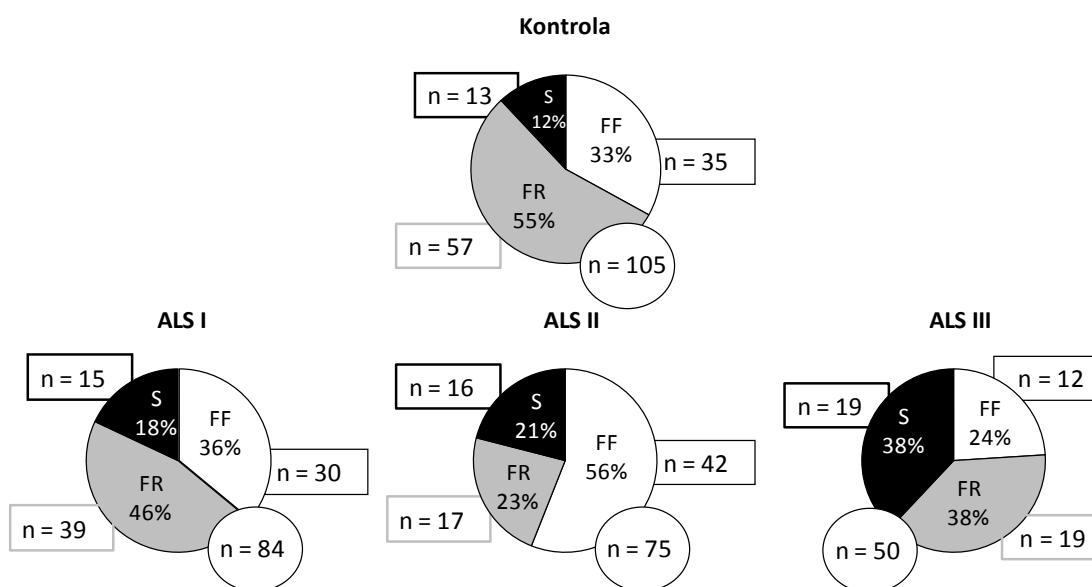
Rys. 7 przedstawia klasyfikację jednostek ruchowych na szybkie (F) i wolne (S) na podstawie indeksu 20 Hz. W większości publikacji jednostki ruchowe dzieli się na F i S na podstawie braku (jednostki S) lub obecności (jednostki F) objawu ugięcia przy częstotliwości drażnienia 40 Hz oraz na podstawie rozkładu wartości czasu skurczu pojedynczego, z wartością graniczną dla mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki u samców szczura 20 ms (Grottel i Celichowski, 1990). Zmiany zachodzące w układzie nerwowo-mięśniowym związane z rozwojem procesu chorobowego powodowały zaburzenia rozkładu tego parametru oraz występowania objawu ugięcia począwszy od grupy ALS I (patrz wyniki 4.4.1. i 4.4.2. oraz rys. 7), dlatego zastosowanie wymienionych cech skurczu do podziału jednostek ruchowych zwierząt transgenicznych na wolne i szybkie pozostawiało część jednostek niesklasyfikowanych. Natomiast wartość graniczna wskaźnika zmęczenia równa 0,5 dzieliła jednostki szybkie na FF (nieodporne na zmęczenie) i FR (odporne na zmęczenie) zarówno w grupie kontrolnej jak i u zwierząt transgenicznych (rys. 8).

Proporcjonalny udział poszczególnych typów jednostek ruchowych był modyfikowany przebiegiem choroby i w grupach badawczych ALS II i ALS III różnił się istotnie w stosunku do grupy kontrolnej i pozostałych grup zwierząt transgenicznych (rys. 9). U zwierząt z grupy ALS I stwierdzono wyższy udział jednostek typu FF i S oraz niższy udział jednostek typu FR, różnice te były jednak statystycznie nieistotne. Podobny kierunek zmian notowano w grupie ALS II, gdzie obserwowano jeszcze wyższy proporcjonalny udział jednostek ruchowych typu FF i S w porównaniu do grupy kontrolnej oraz ALS I (dla FF $p < 0,01$ i $p < 0,05$, odpowiednio w stosunku do grupy kontrolnej i ALS I; dla S w obu przypadkach zmiany statystycznie nieistotne), z równoczesnym ograniczeniem udziału jednostek typu FR ($p < 0,01$ w stosunku do grupy kontrolnej i ALS I). W okresie terminalnym choroby (ALS III) różnice proporcji jednostek ruchowych wolnych w stosunku do grupy



Rys. 8. Podział jednostek ruchowych na trzy typy: FF (białe symbole), FR (szare symbole) i S (czarne symbole) na podstawie indeksu 20 Hz i wskaźnika zmęczenia. Wartości indeksu 20 Hz przedstawiono na osi rzędnych w skali logarytmicznej. Na osi odciętych przedstawiono wartości wskaźnika zmęczenia. Pozioma przerywana linia wyznacza wartość 2,0 indeksu 20 Hz, dzielącą jednostki na szybkie i wolne. Pionowa linia przerywana wyznacza wartość 0,5 wskaźnika zmęczenia, która dzieli jednostki szybkie na nieodporne (FF) i odporne (FR) na zmęczenie. Wykres górny - kontrola, poniżej poszczególne grupy zwierząt transgeniczných (ALS I, ALS II, ALS III).

kontrolnej były największe. Obserwowano trzykrotnie wyższy proporcjonalny udział jednostek typu S ($p < 0,01$), kosztem mniejszego udziału jednostek szybkich obu typów w porównaniu do zwierząt zdrowych. Tak wysoki procentowy udział jednostek S w grupie ALS III był również istotnie wyższy w porównaniu do grup ALS I ($p < 0,05$) i ALS II ($p < 0,05$), a równocześnie udział jednostek FF w tej grupie okazał się istotnie mniejszy w stosunku do grupy ALS II ($p < 0,01$).



Rys. 9. Proporcje trzech typów jednostek ruchowych (FF - kolor biały, FR – kolor szary i S - kolor czarny) w grupie kontrolnej (górze) oraz trzech grupach zwierząt transgenicznych (dół). W prostokątach przedstawiono liczbę badanych jednostek danego typu, w kółkach całkowitą liczbę jednostek dla danej grupy.

4.4. Cechy skurczu jednostek motorycznych

Podstawowe cechy skurczu dla badanych jednostek ruchowych zostały przedstawione w tab. 2, 3 i 4, odpowiednio dla typów FF, FR i S.

Tab. 2. Podstawowe cechy skurczu (wartości średnie \pm SD i zakresy) jednostek ruchowych typu FF w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II i ALS III).

CT – czas skurczu, HRT – czas połowicznego rozkurczu, TwF – siła skurczu pojedynczego, TetF – siła skurczu tężcowego zupełnego, FatI – wskaźnik zmęczenia, Tw/Tet – stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego, PTP – wzmocnienie potężcowe i indeks 20 Hz.

** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; §§ - $p < 0,01$, §- $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I; † - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS II (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

Grupa	CT	HRT	TwF	TetF	Fat I	Tw/Tet	PTP	Indeks 20 Hz
Jednostki typu FF								
Kontrola	15,1 \pm 1,5 (12-19)	14,4 \pm 2,8 (10-22)	115,1 \pm 65,3 (11,0-298,7)	303,4 \pm 156,5 (23,0-549,7)	0,24 \pm 0,12 (0,03-0,48)	0,39 \pm 0,10 (0,19-0,55)	1,39 \pm 0,50 (0,74-3,58)	0,87 \pm 0,10 (0,51-1,05)
ALS I	14,6 \pm 2,5 (10-21)	14,7 \pm 4,8 (9-31)	72,4 \pm 40,3 (3,2-146,5)	225,3 \pm 106,3 (11,9-457,6)	0,24 \pm 0,14 (0,02-0,45)	0,31 \pm 0,10 (0,09-0,47)	1,38 \pm 0,28 (0,73-1,87)	0,94 \pm 0,14 *
ALS II	13,2 \pm 2,1 (9-22) ** §	12,6 \pm 3,5 (8-28) *	73,2 \pm 54,3 (5,4-280,3) **	253,3 \pm 138,8 (12,0-811,2)	0,22 \pm 0,12 (0,05-0,46)	0,27 \pm 0,11 (0,09-0,57) **	1,43 \pm 0,41 (0,67-2,46)	0,86 \pm 0,12 (0,56-1,09) §§
ALS III	14,6 \pm 2,0 (12-18)	15,6 \pm 3,2 (10-19) †	67,3 \pm 45,1 (4,6-168,5)	271,4 \pm 173,7 (15,8-547,7)	0,29 \pm 0,17 (0,03-0,49)	0,27 \pm 0,07 (0,17-0,40) **	1,17 \pm 0,25 (0,68-1,68)	0,81 \pm 0,21 (0,21-1,01)

Tab. 3. Podstawowe cechy skurczu (wartości średnie \pm SD i zakresy) jednostek ruchowych typu FR w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II i ALS III).

CT – czas skurczu, HRT – czas połowicznego rozkurczu, TwF – siła skurczu pojedynczego, TetF – siła skurczu tężcowego zupełnego, FatI – wskaźnik zmęczenia, Tw/Tet – stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego, PTP – wzmocnienie potężcowe i indeks 20 Hz.

** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; §§ - $p < 0,01$, §- $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I; ††- $p < 0,01$, † - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS II (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

Grupa	CT	HRT	TwF	TetF	Fat I	Tw/Tet	PTP	indeks 20 Hz
Jednostki typu FR								
Kontrola	15,5 \pm 2,6 (11-21)	17,7 \pm 3,9 (12-28)	35,7 \pm 26,5 (7,3-116,0)	163,0 \pm 98,8 (54,0-638,1)	0,85 \pm 0,13 (0,51-1,00)	0,21 \pm 0,08 (0,09-0,44)	1,48 \pm 0,41 (0,82-2,53)	1,00 \pm 0,14 (0,68-1,79)
ALS I	14,8 \pm 1,9 (12-18)	16,9 \pm 4,0 (10-27)	28,9 \pm 25,0 (2,6-121,8)	134,0 \pm 86,3 (31,1-506,4)	0,72 \pm 0,14 (0,51-1,00) **	0,20 \pm 0,06 (0,07-0,36)	1,50 \pm 0,40 (0,86-2,41)	1,03 \pm 0,09 (0,85-1,30)
ALS II	13,5 \pm 1,5 (11-16) *	14,5 \pm 3,7 (9-24) *	29,8 \pm 20,3 (11,0-74,7)	140,4 \pm 63,9 (62,5-317,9)	0,71 \pm 0,15 (0,50-0,99) **	0,20 \pm 0,08 (0,11-0,39)	1,65 \pm 0,79 (0,86-3,90)	0,97 \pm 0,08 (0,84-1,15)
ALS III	17,7 \pm 3,6 (12-26) § ††	23,8 \pm 6,5 (11-36) ** §§ ††	29,8 \pm 34,3 (2,1-158,7)	139,3 \pm 107,8 (8,7-414,4)	0,73 \pm 0,15 (0,53-0,96) *	0,20 \pm 0,07 (0,12-0,38)	1,11 \pm 0,19 (0,96-1,83) ** §§ ††	1,21 \pm 0,38 (0,67-1,98) †

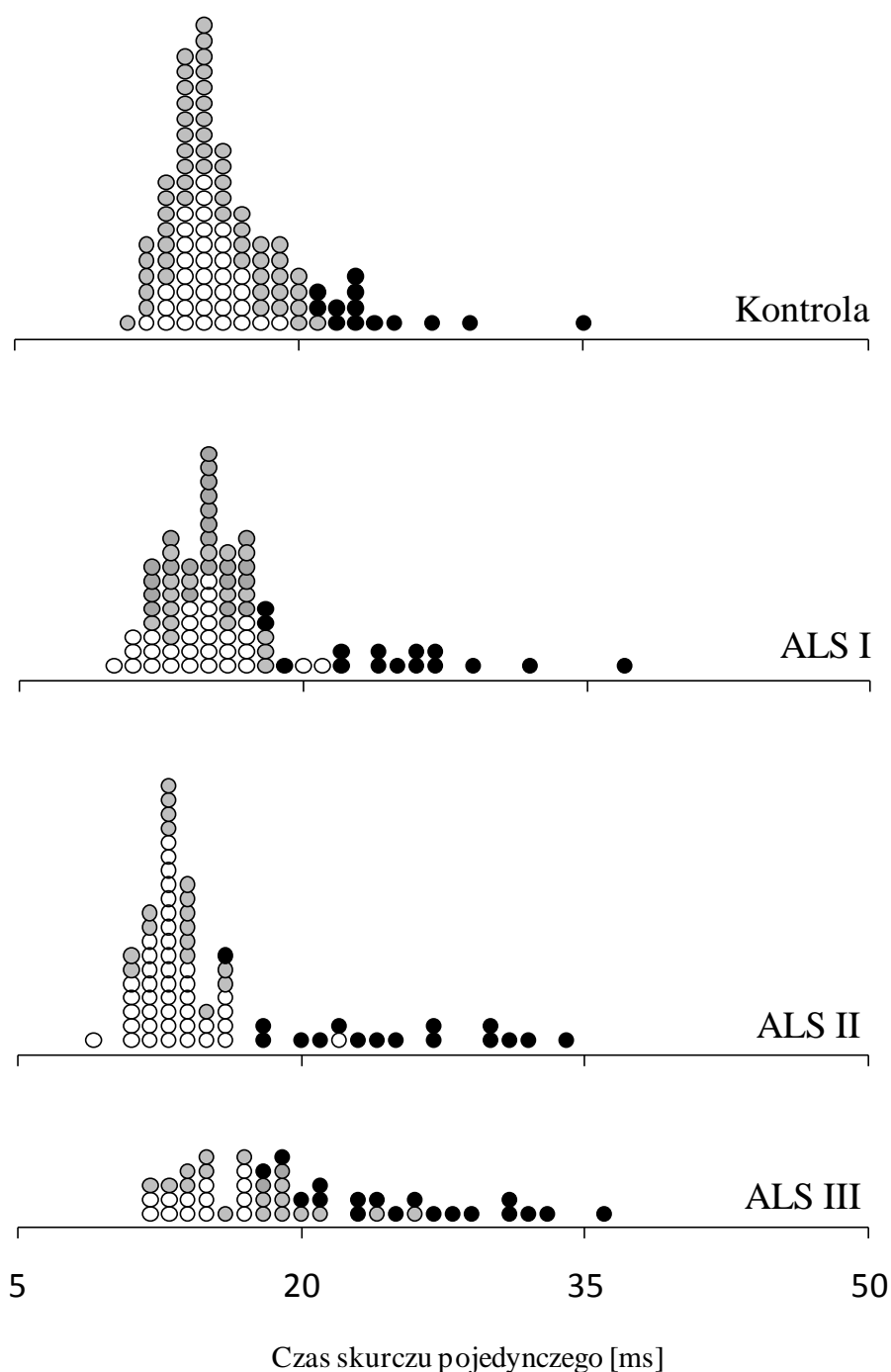
Tab. 4. Podstawowe cechy skurczu (wartości średnie \pm SD i zakresy) jednostek ruchowych typu S w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II i ALS III).

CT – czas skurczu, HRT – czas połowicznego rozkurczu, TwF – siła skurczu pojedynczego, TetF – siła skurczu tężcowego zupełnego, FatI – wskaźnik zmęczenia, Tw/Tet – stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego, PTP – wzmocnienie potężcowe i indeks 20 Hz.

** - $p < 0,01$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; §§ - $p < 0,01$, §- $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I; ††- $p < 0,01$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS II (ANOVA rang Kruskala-Wallisa).

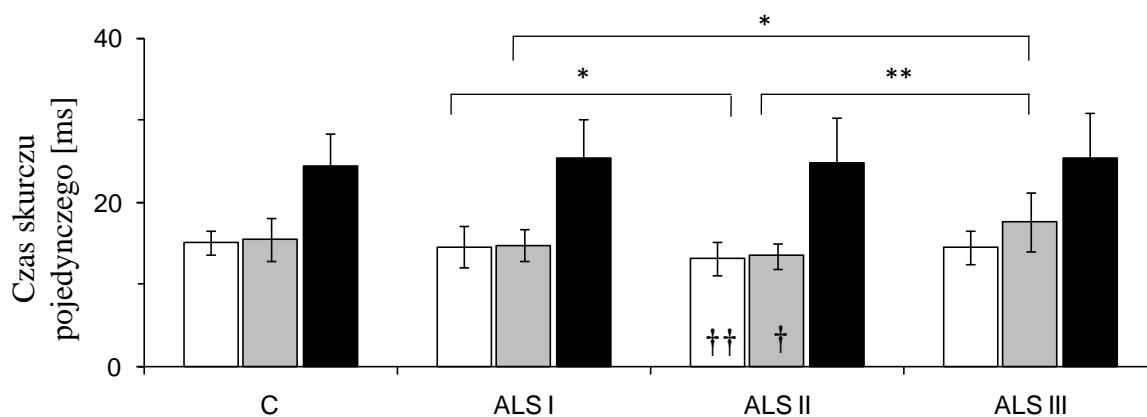
Grupa	CT	HRT	TwF	TetF	Fat I	Tw/Tet	PTP	Indeks 20 Hz
Jednostki typu S								
Kontrola	24,5 \pm 3,9 (21-35)	34,1 \pm 6,7 (25-49)	7,4 \pm 2,2 (4,6-12,7)	76,8 \pm 18,2 (47,1-114,8)	0,99 \pm 0,02 (0,92-1,00)	0,10 \pm 0,02 (0,06-0,12)	0,95 \pm 0,25 (0,65-1,68)	6,65 \pm 1,58 (3,92-9,36)
ALS I	25,5 \pm 4,7 (18-37)	30,7 \pm 3,9 (24-40)	6,7 \pm 3,3 (2,9-16,6)	67,5 \pm 24,8 (39,6-137,9)	0,98 \pm 0,03 (0,89-1,00)	0,10 \pm 0,03 (0,06-0,19)	0,88 \pm 0,12 (0,70-1,20)	5,91 \pm 2,27 (2,62-10,49)
ALS II	24,9 \pm 5,5 (16-34)	38,1 \pm 8,2 (23-56) §	7,9 \pm 3,0 (3,7-14,2)	76,4 \pm 18,1 (58,6-135,3)	0,92 \pm 0,15 (0,46-1,00)	0,10 \pm 0,03 (0,06-0,18)	0,90 \pm 0,18 (0,40-1,22)	5,98 \pm 1,37 (2,82-8,34)
ALS III	25,5 \pm 5,5 (17-36)	33,6 \pm 7,5 (15-44)	23,4 \pm 16,6 (0,1-57,5) §§	115,2 \pm 76,8 (2,2-276,6) §	0,73 \pm 0,23 (0,11-0,94) ** §§ ††	0,19 \pm 0,05 (0,05-0,27) ** §§ ††	1,01 \pm 0,12 (0,59-1,11) §§	2,76 \pm 0,59 (2,24-4,38) ** §§ ††

4.4.1. Czas skurczu i połowicznego rozkurczu

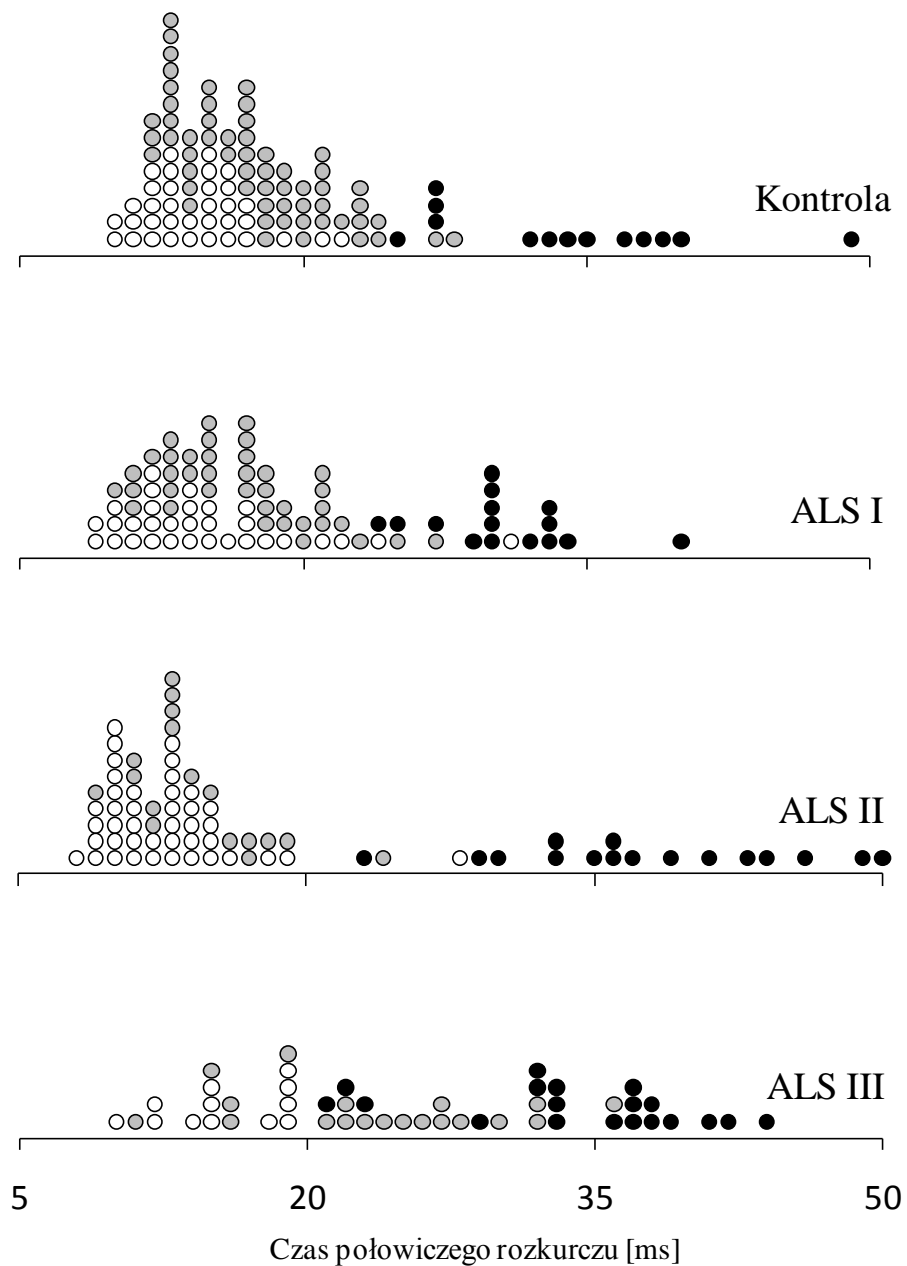


Rys. 10. Rozkład wartości czasów skurczu trzech typów jednostek motorycznych: FF – białe symbole, FR – szare symbole, S – czarne symbole. U góry histogram dla grupy kontrolnej, poniżej dla trzech grup zwierząt transgenicznnych (ALS I, ALS II, ALS III).

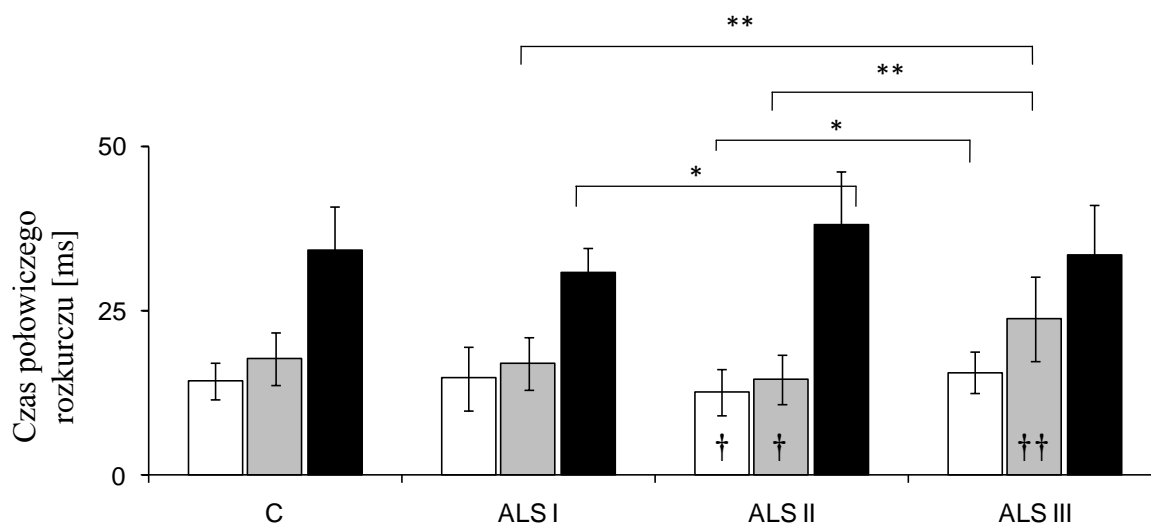
Rys. 10 przedstawia rozkład wartości czasu skurczu dla wszystkich badanych jednostek (z uwzględnieniem ich typów) w 4 grupach badawczych, natomiast wartości średnie dla poszczególnych typów jednostek ruchowych przedstawiono na rys. 11. Dla jednostek FF zwierząt transgenicznych czas skurczu średnio był we wszystkich grupach krótszy w stosunku do zdrowych zwierząt kontrolnych, przy czym różnice były istotne statystycznie jedynie dla grupy ALS II ($p < 0,01$). W obrębie zwierząt z ALS statystycznie istotna różnica czasu skurczu jednostek FF występowała pomiędzy grupami ALS II i ALS I ($p < 0,05$). Dla jednostek FR czas skurczu średnio był istotnie krótszy w odniesieniu do kontroli tylko w grupie ALS II ($p < 0,05$), w pozostałych grupach zwierząt transgenicznych brak było różnic statystycznych w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie ALS III stwierdzono średnio najdłuższy czas skurczu jednostek FR, a różnice okazały się statystycznie istotne w porównaniu z grupami ALS I ($p < 0,05$) oraz ALS II ($p < 0,01$). Dla jednostek wolnych wartości czasu skurczu statystycznie się nie różniły.



Rys. 11. Średnie wartości czasu skurczu pojedynczego (\pm SD) poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ – poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallisa).



Rys. 12. Rozkład wartości czasów połowiczego rozkurczu trzech typów jednostek motorycznych: FF – białe symbole, FR – szare symbole, S – czarne symbole. U góry wykres dla grupy kontrolnej, poniżej dla trzech grup zwierząt transgeniczných (ALS I, ALS II, ALS III).

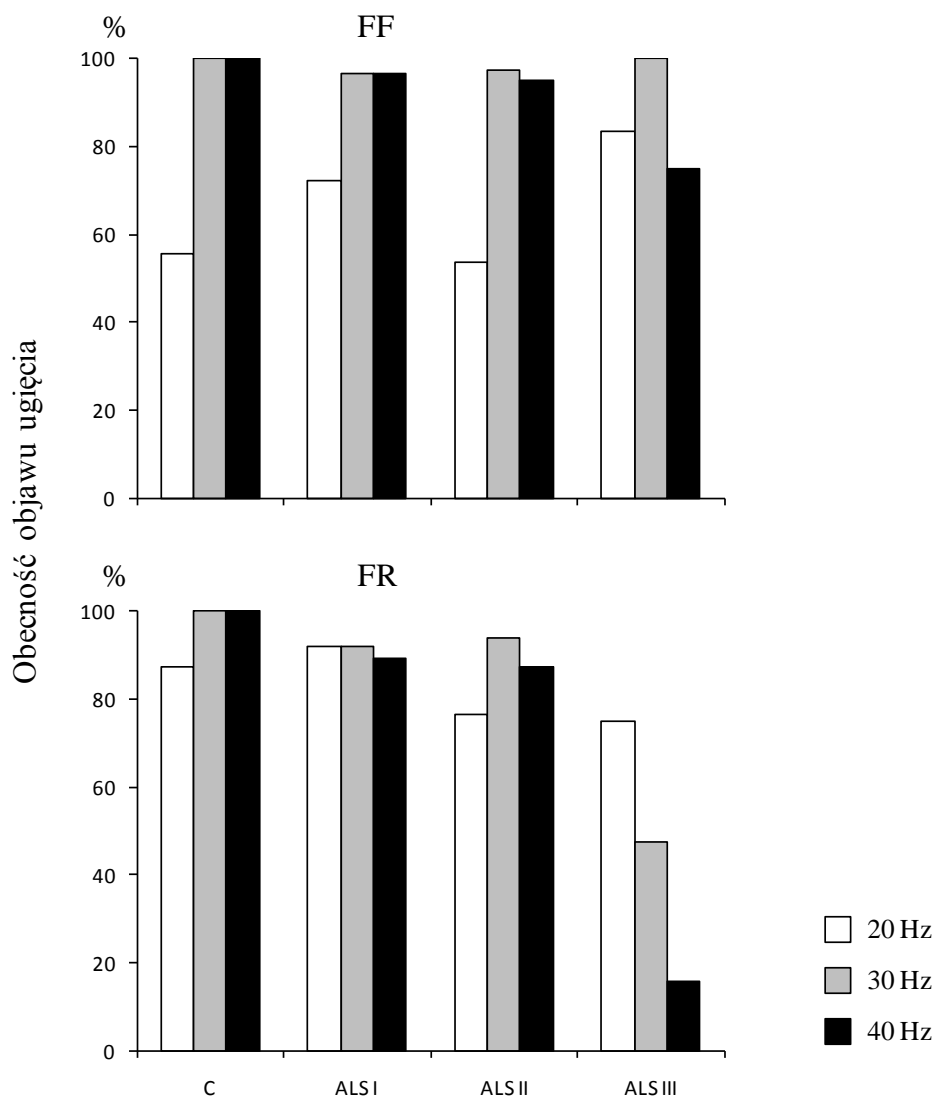


Rys. 13. Średnie wartości czasu połowicznego rozkurczu (\pm SD) poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ – poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

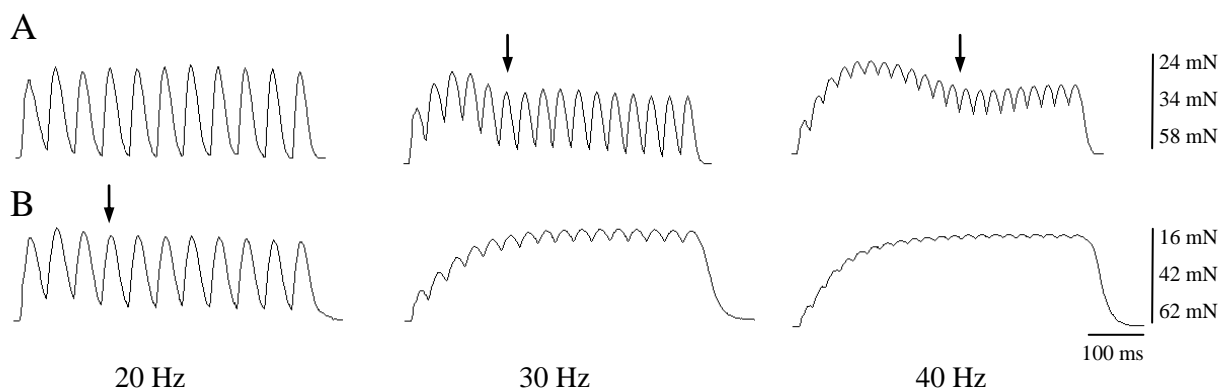
Średnie wartości czasu połowicznego rozkurczu jednostek FF były istotnie niższe tylko w grupie ALS II, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$), jak i ALS III ($p < 0,01$) (rys. 12 i 13). Dla jednostek FR czas połowicznego rozkurczu średnio był najdłuższy w grupie ALS III, w porównaniu do niższych wartości notowanych we wszystkich pozostałych grupach badawczych (różnica istotna statystycznie w odniesieniu do wszystkich grup, $p < 0,01$). Najniższą średnią wartość dla jednostek FR czas połowicznej relaksacji przyjmował w grupie ALS II i była to wartość istotnie niższa w stosunku do kontroli ($p < 0,05$). Czas połowicznego rozkurczu jednostek wolnych nie różnił się istotnie w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast w obrębie grup zwierząt z ALS istotna różnica ($p < 0,05$) wystąpiła pomiędzy grupami ALS I (wartość najniższa) i ALS II (wartość najwyższa) (rys. 12 i 13).

4.4.2. Objaw ugięcia

Analiza przebiegu skurczów tężcowych jednostek ruchowych zwierząt transgenicznych przy częstotliwościach stymulacji 20, 30 i 40 Hz wykazała, że część jednostek szybkich nie posiadała objawu ugięcia, a wraz z progresją procesu chorobowego w kolejnych grupach odsetek takich jednostek wzrastał (rys. 14 i 15).



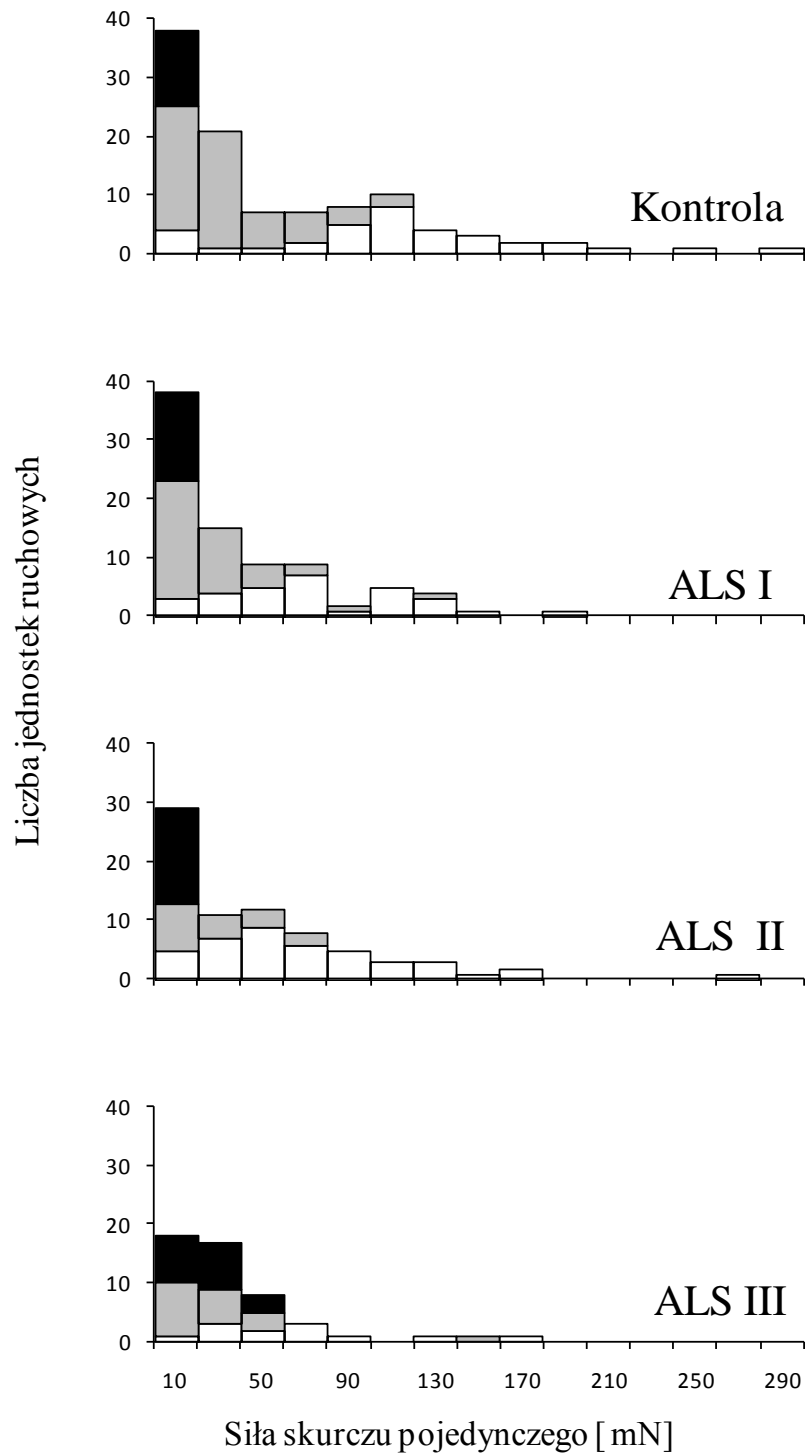
Rys. 14. Obecność objawu ugięcia dla jednostek typu FF (górną) i FR (dolną) dla skurczów tężcowych niepełnych przy stymulacji z częstotliwościami 20 Hz (kolor biały), 30 Hz (kolor szary), 40 Hz (kolor czarny) dla grupy kontrolnej (C) i trzech grup zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III).



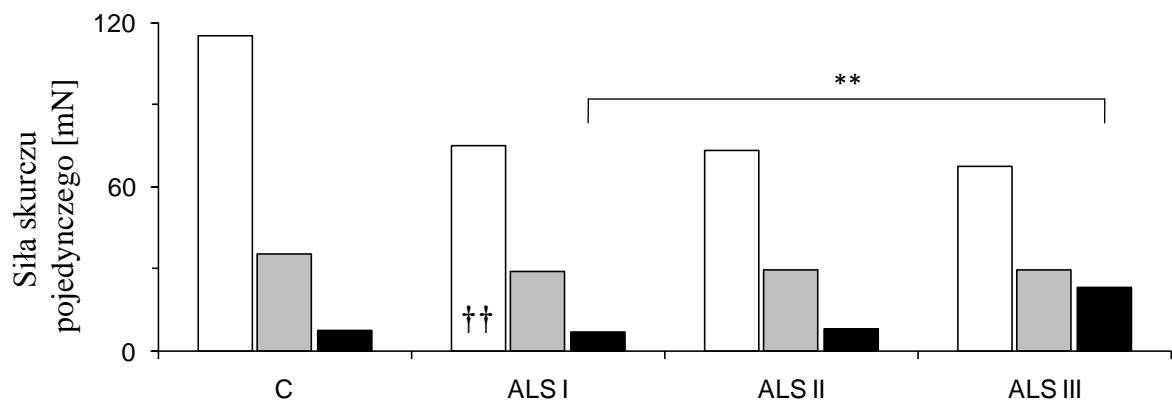
Rys. 15. Przykłady typowych przebiegów skurczów tężcowych niezupełnych dwóch jednostek szybkich typu FR przy różnych częstotliwościach drażnienia (od lewej 20 Hz, 30 Hz, 40 Hz) u szczurów z grupy kontrolnej (A) i z grupy ALS II (B). Strzałkami zaznaczono objaw ugięcia.

4.4.3. Siła skurczu pojedynczego i tężcowego

Średnia wartość siły skurczu pojedynczego jednostek typu FF we wszystkich grupach zwierząt transgenicznych była niższa w stosunku do średniej wartości dla zwierząt kontrolnych (różnica istotna statystycznie jedynie dla grupy ALS II, $p < 0,01$, w pozostałych grupach wartości na granicy istotności) (rys. 16 i 17). Dla jednostek typu FR średnia wartość siły skurczu pojedynczego nie ulegała istotnym zmianom (rys. 17). Jednostki wolne zwierząt transgenicznych wykazywały największe zmiany siły skurczu pojedynczego w grupie ALS III. Siły skurczu tych jednostek u zwierząt z grupy ALS I i ALS II były podobne jak w grupie kontrolnej, natomiast w grupie terminalnej parametr ten osiągał wartość niemal trzykrotnie wyższą w porównaniu do kontroli. Mimo takiego wzrostu zmiana ta była istotna tylko w odniesieniu do grupy ALS I ($p < 0,01$), natomiast w stosunku do grupy kontrolnej i ALS II na granicy istotności. Dla jednostek wolnych poszerzał się zakres siły skurczu pojedynczego, szczególnie w grupie ALS III, w której pojawiały się jednostki znacznie silniejsze w porównaniu do grupy kontrolnej (rys. 16).

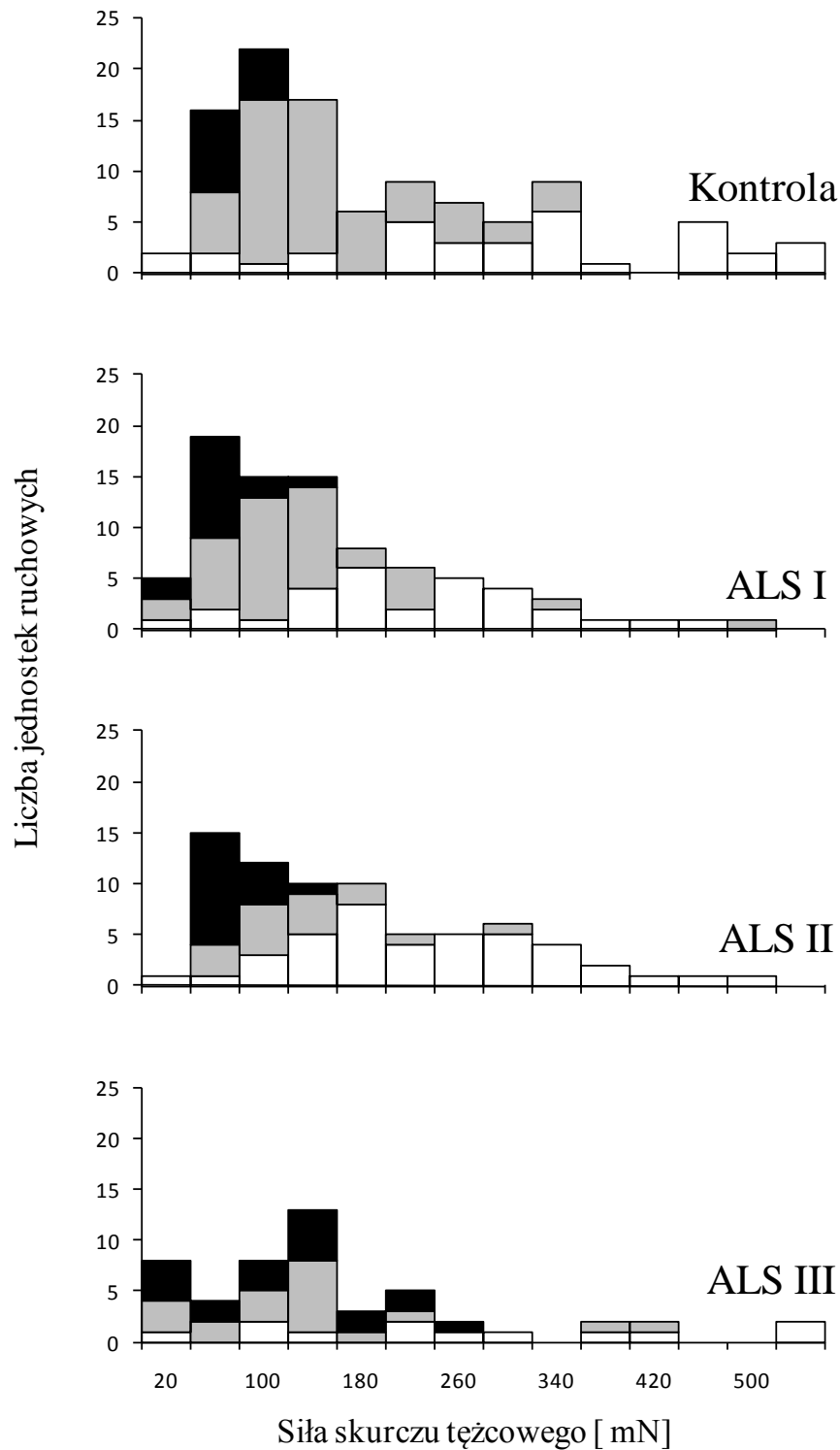


Rys. 16. Histogram wartości sił skurczów pojedynczych w poszczególnych typach jednostek motorycznych (FF – biały kolor, FR – szary kolor, S – czarny kolor) w grupie kontrolnej – górny wykres i w trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III).

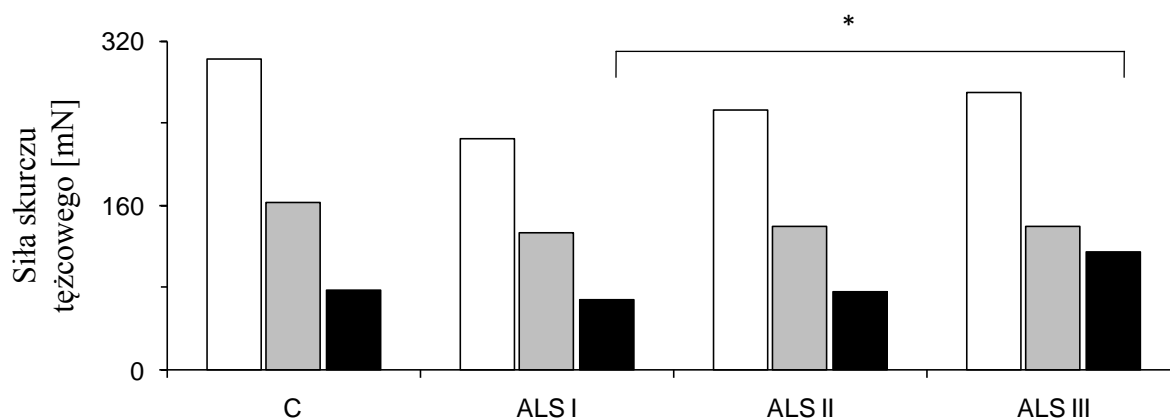


Rys. 17. Średnie wartości siły skurczu pojedynczego poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). ** - $p < 0,01$ – poziom istotności statystycznej różnicy pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$ - poziom istotności różnicy w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupku (ANOVA rang Kruskala-Wallisa).

Średnia wartość siły skurczu tężcowego zupełnego dla jednostek szybkich obu typów pozostawała na podobnym poziomie we wszystkich grupach (rys. 18 i 19), a różnice były statystycznie nieistotne. Dla jednostek wolnych istotne zmiany siły skurczu tężcowego obserwowano pomiędzy grupami ALS I, gdzie stwierdzono najniższą średnią wartość tej siły, a grupą ALS III, z najwyższą średnią siły skurczu tężcowego ($p < 0,05$) (rys. 18 i 19).



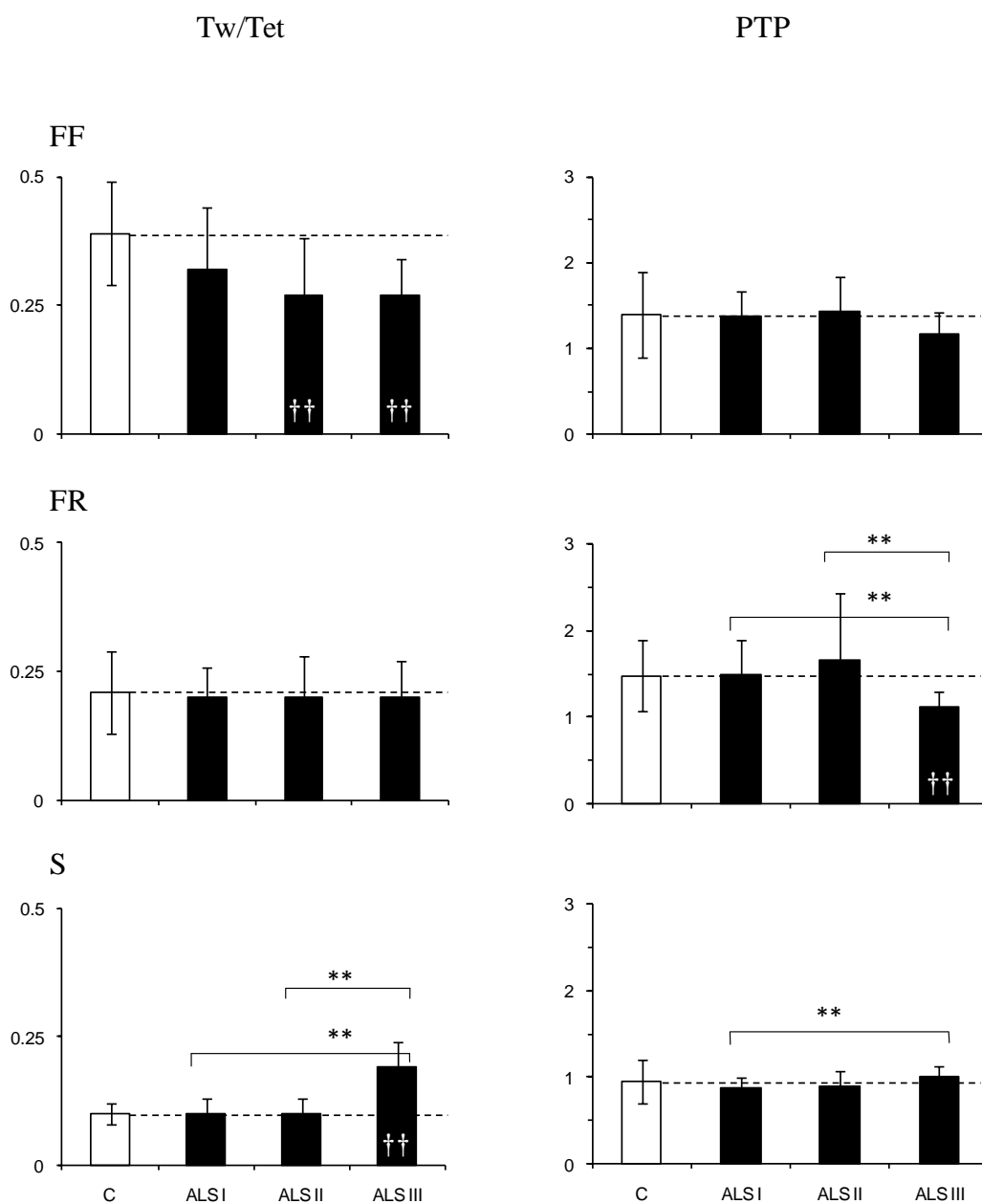
Rys. 18. Histogram wartości sił skurczów tężcowych zupełnych (150 Hz) w poszczególnych typach jednostek motorycznych (FF – biały kolor, FR – szary kolor, S – czarny kolor) w grupie kontrolnej – górny wykres i w trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III).



Rys. 19. Średnie wartości siły skurczu tężcowego zupełnego (150 Hz) poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnicy pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

4.4.4. Potężcowe wzmocnienie siły skurczu

Analiza zdolności do wzmocnienia siły skurczu jednostek ruchowych typu FF i FR wykazała, że w grupach ALS I i ALS II siła szybkich jednostek wzmacnia się podobnym stopniu co w grupie kontrolnej (różnice statystycznie nieistotne), a w grupie ALS III obserwowano spadek tego efektu dla jednostek szybkich w odniesieniu do grupy kontrolnej (dla jednostek FR zmiana istotna statystycznie w stosunku do wszystkich pozostałych grup, $p < 0,01$). Jednostki wolne wszystkich grup zwierząt transgenicznych, podobnie jak w grupie kontrolnej w większości nie miały zdolności do wzmocnienia siły skurczu, choć w każdej z grup pojawiały się pojedyncze jednostki, w których takie wzmocnienie występowało. Istotną statystycznie różnicę potężcowego wzmocnienia siły skurczu jednostek wolnych zaobserwowano między grupami ALS I i ALS III, w której badany parametr zwiększył swoją wartość ($p < 0,01$) (rys. 20).



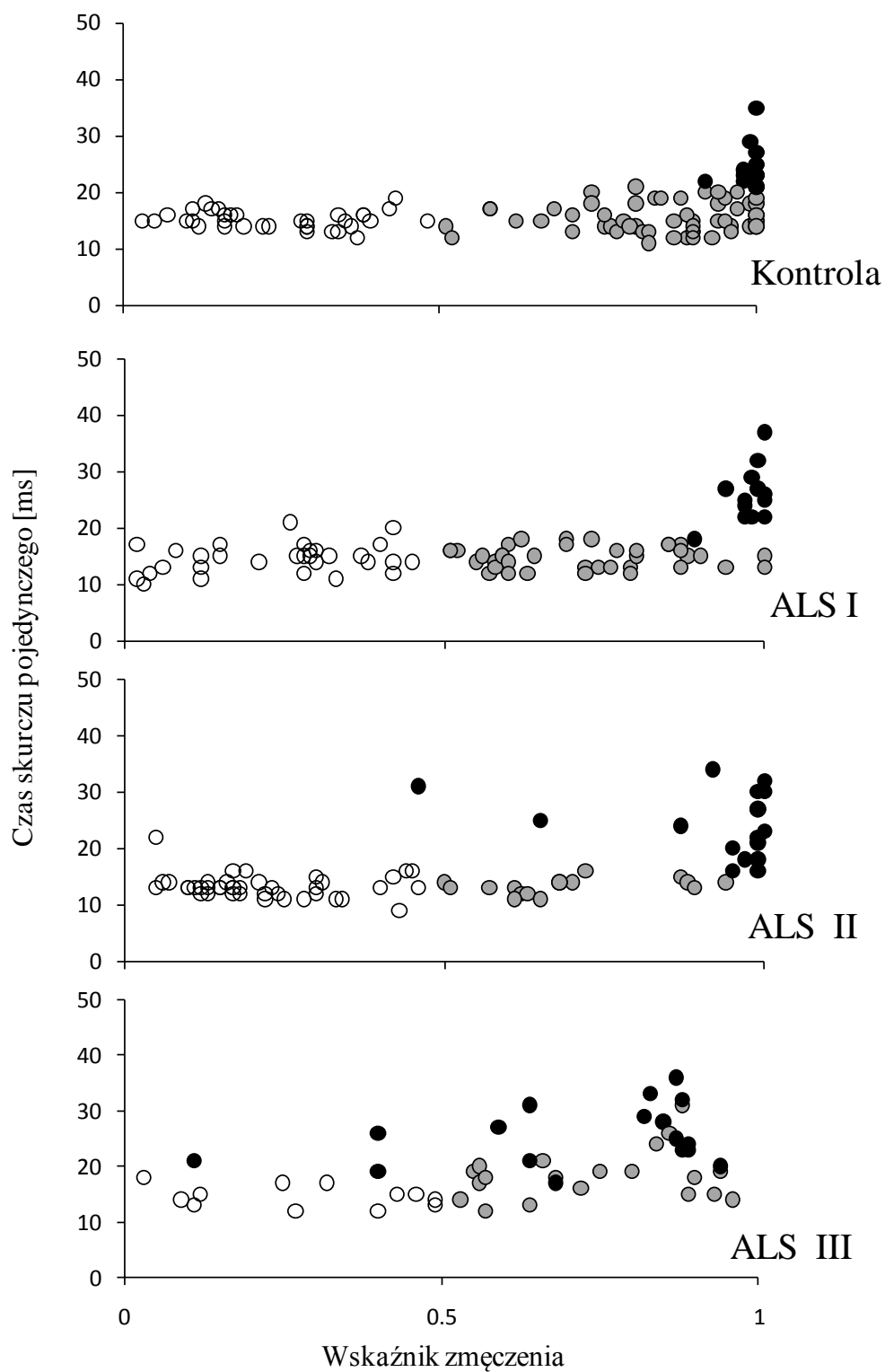
Rys. 20. Wartości średnie (\pm SD) stosunku sił skurczu pojedynczego do tężcowego zupełnego (Tw/Tet, lewa kolumna) oraz wzmocnienia potężcowego sił skurczu (PTP, prawa kolumna) dla trzech typów jednostek motorycznych (od góry: FF, FR i S) w czterech grupach badanych zwierząt: kontrolnej (C) oraz ALS I, ALS II i ALS III. ** - $p < 0,01$ - poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$ - poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

4.4.5. Stosunek sił skurczu pojedynczego do tężcowego

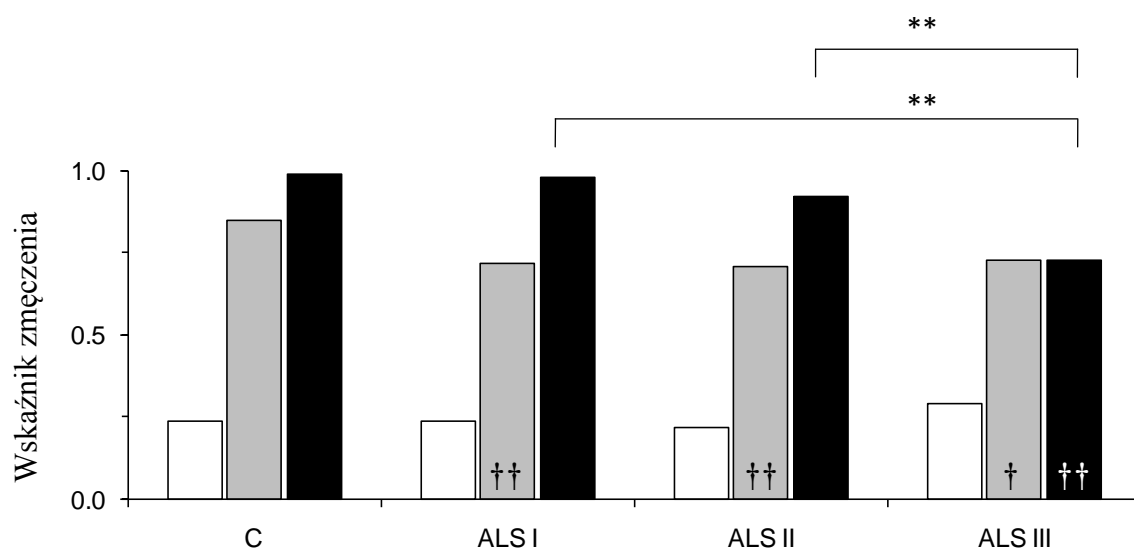
Stosunek sił skurczu pojedynczego do tężcowego (T_w/T_{et}) w jednostkach FF wszystkich grup zwierząt z ALS był niższy w porównaniu z grupą kontrolną (różnice statystycznie istotne dla grup ALS II i ALS III, $p < 0,01$, dla grupy ALS I na pograniczu istotności) (rys. 20). Jednostki typu FR zwierząt transgenicznych również charakteryzowały się niższymi, choć statystycznie nieistotnymi, wartościami tego wskaźnika w porównaniu do grupy kontrolnej (rys. 20). W puli jednostek wolnych analizowany stosunek sił był dwukrotnie wyższy w porównaniu do wartości kontrolnych w grupie ALS III ($p < 0,01$), równocześnie wartość ta była istotnie wyższa w odniesieniu do grup ALS I i ALS II ($p < 0,01$) (rys. 20).

4.4.6. Odporność na zmęczenie

Wartości wskaźnika zmęczenia w grupie kontrolnej wykazywały bimodalne rozłożenie, z wartością graniczną równą 0,5 (rys. 8 i 21). U zwierząt transgenicznych, począwszy od grupy ALS I, rozłożenie takie zanikało. Średnia wartość wskaźnika zmęczenia jednostek FF nie różniła się znacząco w żadnej z grup zwierząt transgenicznych w porównaniu do grupy kontrolnej, choć wartość tego parametru w grupie ALS III była nieco wyższa w stosunku do kontroli (rys. 22). Dla jednostek typu FR średnia wartość wskaźnika zmęczenia była niższa we wszystkich grupach zwierząt transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną (dla grup ALS I i ALS II $p < 0,01$; dla grupy ALS III $p < 0,05$) (rys. 22). Jednostki wolne zwierząt transgenicznych również charakteryzowały się niższą odpornością na zmęczenie w odniesieniu do kontroli, szczególnie w grupie ALS III ($p < 0,01$). Wartość średnia wskaźnika zmęczenia u zwierząt z grupy ALS III była także istotnie statystycznie niższa w stosunku do grup ALS I i ALS II ($p < 0,01$) (rys. 22).



Rys. 21. Rozłożenie wartości wskaźnika zmęczenia i czasu skurczu poszczególnych typów jednostek ruchowych w grupie kontrolnej (górnicy) i trzech grupach zwierząt transgenicznym. Jednostki ruchowe typu FF – białe symbole, FR – szare symbole, S – czarne symbole.



Rys. 22. Średnie wartości wskaźnika zmęczenia poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicyjnych (ALS I, ALS II, ALS III). ** - $p < 0,01$ - poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicyjnych, †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallisa).

Warto zaznaczyć, że zmiany odporności na zmęczenie rozwijające się wraz z postępem choroby powodowały stopniowe ujednocianie populacji jednostek ruchowych pod względem tej cechy (np. w grupie terminalnej średnie wartości analizowanego wskaźnika dla jednostek FR i S były takie same) (rys. 22).

4.5. Zmiany zależności siły skurczu od częstotliwości drażnienia

Podstawowe cechy opisujące przebieg krzywej zależności siły skurczu od częstotliwości drażnienia dla trzech typów jednostek ruchowych (FF, FR i S) w badanych grupach zostały przedstawione w tab. 5.

Tab. 5. Wartości średnie (\pm SD) oraz zakresy wartości badanych cech opisujących zależność siły skurczu od częstotliwości drażnienia trzech typów jednostek ruchowych (FF, FR i S), dla czterech grup badanych zwierząt.

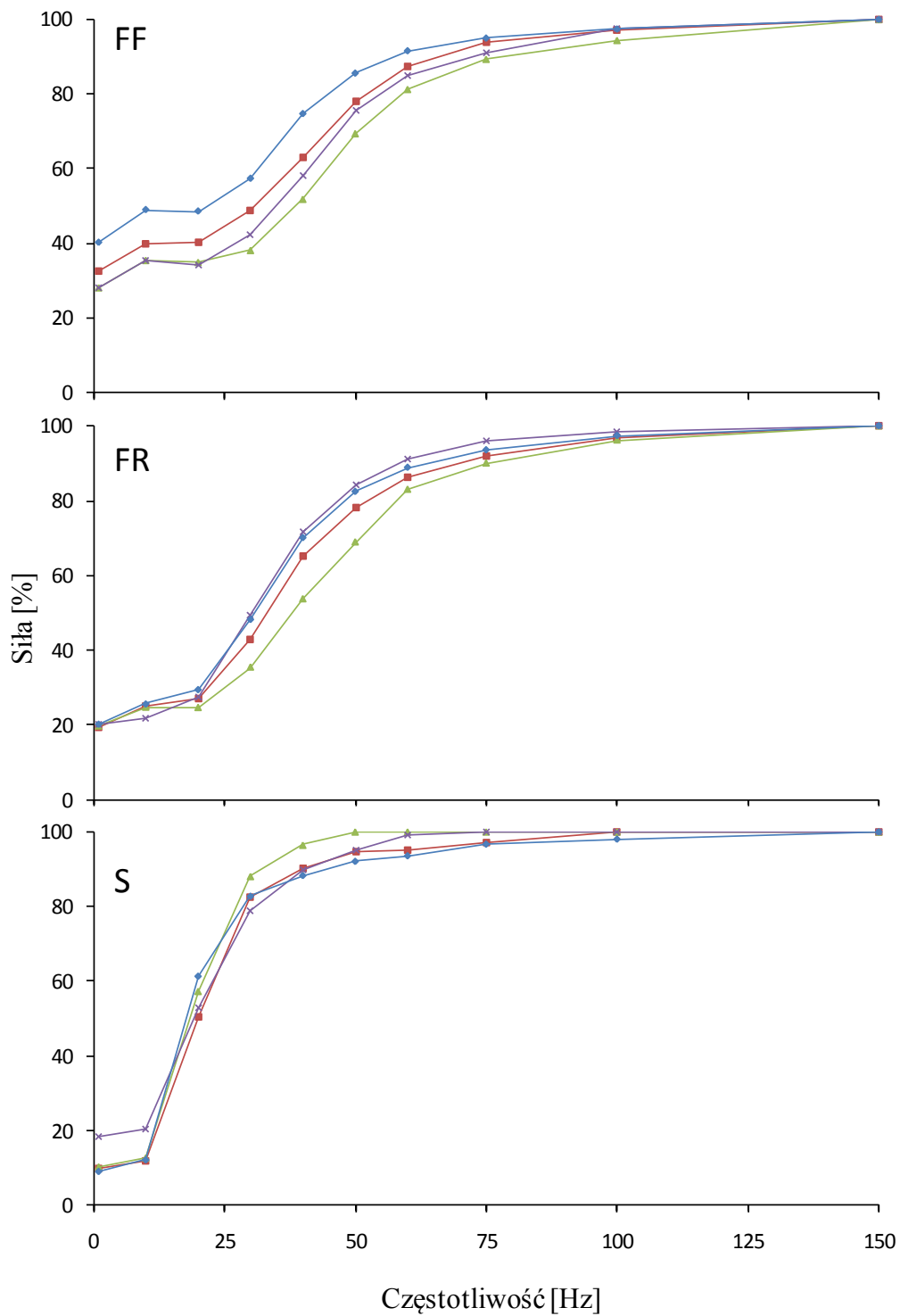
60%Fmax – częstotliwość stymulacji odpowiadającej sile skurczu wynoszącej 60% maksymalnej siły jednostki ruchowej, nachylenie – nachylenie stromej części wykresu, mierzone na wysokości wartości 60% siły maksymalnej.

** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; §- $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I; ††- $p < 0,01$, † - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS II (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

	FF		FR		S	
	60%Fmax [Hz]	Nachylenie (%Fmax/1Hz)	60%Fmax [Hz]	Nachylenie (%Fmax/1Hz)	60%Fmax [Hz]	Nachylenie (%Fmax/1Hz)
Kontrola	30.1 \pm 8.6 (8.1-43.5)	1.7 \pm 0.5 (0.7-2.8)	35.0 \pm 6.1 (22.3-49.3)	2.5 \pm 0.6 (1.3-4.6)	20.3 \pm 3.2 (17.6-26.5)	5.0 \pm 1.2 (2.7-6.2)
ALS I	37.1 \pm 10.2 (8.8-54.3) *	1.9 \pm 0.5 (0.8-2.7)	37.7 \pm 6.8 (25.8-62.9)	2.3 \pm 0.5 (1.5-3.7)	22.3 \pm 2.9 (18.1-27.1)	4.2 \pm 1.2 (2.2-5.9)
ALS II	43.4 \pm 9.5 (26.0-65.6) **	2.0 \pm 0.5 (0.4-2.9) *	42.9 \pm 9.6 (27.7-59.2) **	2.7 \pm 0.9 (1.5-4.8)	21.0 \pm 3.1 (16.0-27.1)	4.5 \pm 1.3 (2.8-6.7)
ALS III	37.5 \pm 13.7 (3.2-50.7) *	2.4 \pm 0.7 (1.5-3.5) **	34.8 \pm 7.4 (24.6-50.7) †	2.8 \pm 0.7 (1.5-4.1) §	22.9 \pm 5.3 (15.7-40.5)	3.1 \pm 0.7 (1.8-4.4) ** ††

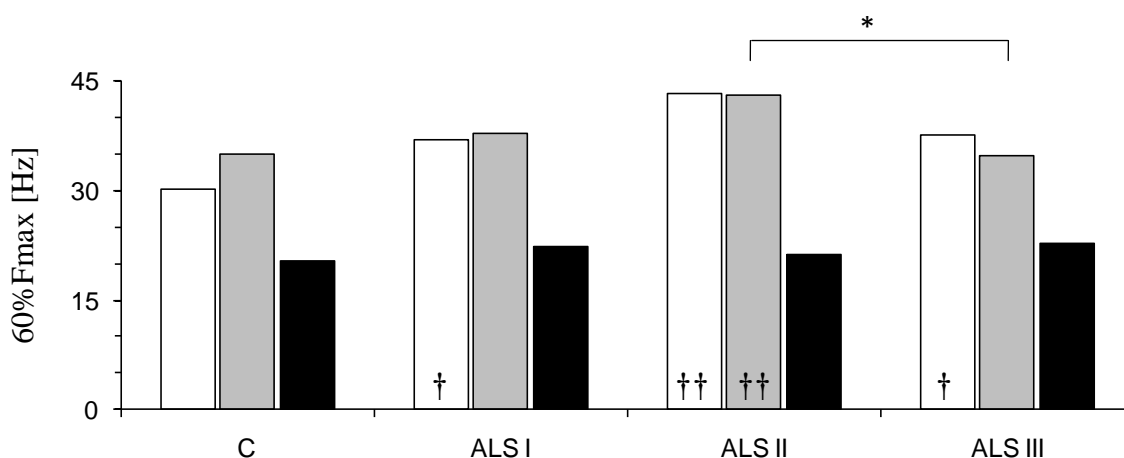
Zmiany przebiegu krzywych zależności siły skurczu od częstotliwości stymulacji jednostek FF zwierząt transgenicznych miały dla wszystkich grup ten sam kierunek. Strome części tych krzywych przesunęły się w stronę prawą (w kierunku wyższych częstotliwości) w stosunku do krzywej wykreślonej dla jednostek FF grupy kontrolnej. Najbardziej w prawą stronę przesunięta była krzywa dla jednostek FF grupy ALS II (rys. 23). Taki kierunek zmian w grupach ALS I, ALS II i ALS III wiązał się z obserwowaną w tych grupach wyższą częstotliwością stymulacji niezbędną do wygenerowania 60% siły maksymalnej w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$ dla ALS I i ALS III; $p < 0,05$ dla ALS II) (rys. 24). Równocześnie we wszystkich grupach zwierząt transgenicznych wartość pochylenia krzywej występująca na wysokości 60% siły maksymalnej, określająca względny przyrost siły skurczu przy wzroście częstotliwości drażnienia o 1 Hz, była wyższa w stosunku do grupy kontrolnej (różnice istotne statystycznie dla grup ALS II na poziomie $p < 0,05$ oraz ALS III na poziomie $p < 0,01$) (rys. 25).

Krzywe siła-częstotliwość dla jednostek FR w grupie ALS I i ALS II także przesunęły się w stronę wyższych częstotliwości drażnienia (w prawo) w stosunku do krzywej wykreślonej dla jednostek FR grupy kontrolnej (rys. 23). Dla tych dwóch grup częstotliwość stymulacji niezbędna do wygenerowania 60% siły była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (istotna statystycznie dla grupy ALS II, $p < 0,01$) (rys. 24), a nachylenie krzywej nie zmieniało się istotnie w porównaniu z kontrolą (rys. 25). W grupie ALS III przebieg krzywej dla jednostek FR niemal pokrywał się z krzywą dla jednostek FR grupy kontrolnej (rys. 23). W tej grupie notowano też najniższą częstotliwość stymulacji niezbędną do wygenerowania 60% siły maksymalnej (różnica ta była istotna w stosunku do grupy ALS II, $p < 0,05$) (rys. 24), natomiast nachylenie krzywej było w tej grupie największe spośród wszystkich grup (statystyczną istotność stwierdzono tylko w stosunku do grupy ALS I, $p < 0,05$) (rys. 25).

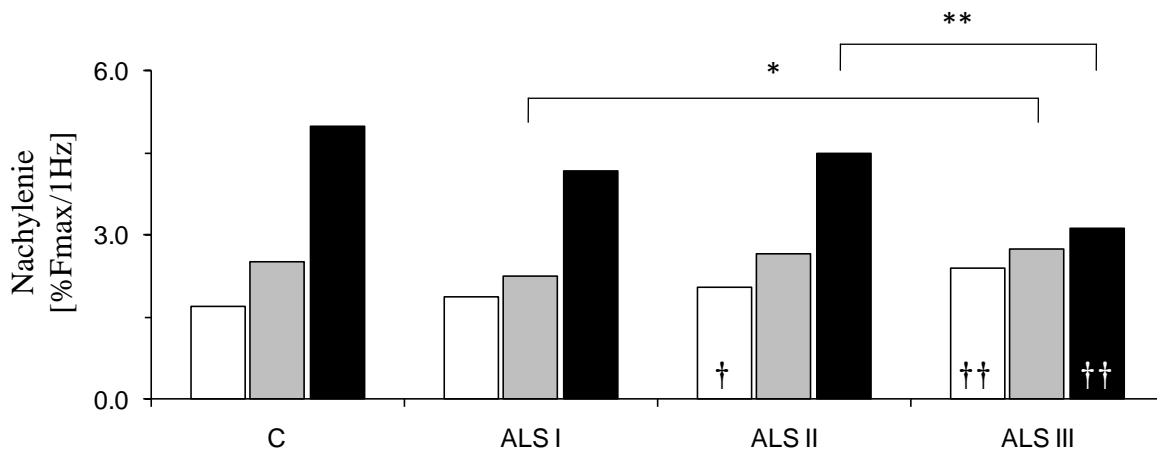


Rys. 23. Uśrednione wykresy zależności między względną, średnią siłą skurczu a częstotliwością drażnienia dla trzech typów jednostek ruchowych: FF – górny wykres, FR – środkowy wykres, S – dolny wykres we wszystkich grupach badawczych. Grupa kontrolna – kolor niebieski, ALS I – kolor czerwony, ALS II – kolor zielony, ALS III – kolor fioletowy.

Przebieg krzywych siła-częstotliwość jednostek wolnych zwierząt transgenicznych nie różnił się istotnie w porównaniu do krzywych wykreślonych dla jednostek wolnych zwierząt grupy kontrolnej (braki istotnych zmian w częstotliwość niezbędnej do wygenerowania 60% siły dla grup ALS I, ALS II i ALS III) (rys. 23). Jediną zmianę w przebiegu krzywych wykreślonych dla jednostek S odnotowano w grupie ALS III, w której początek krzywej przesunięty był w kierunku wyższych procentowych wartości sił (w górę), co pociągało za sobą niższą w stosunku do pozostałych grup wartość nachylenia krzywej występującą na poziomie 60% siły maksymalnej (różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,01$ w odniesieniu do grupy kontrolnej i ALS II) (rys. 25).

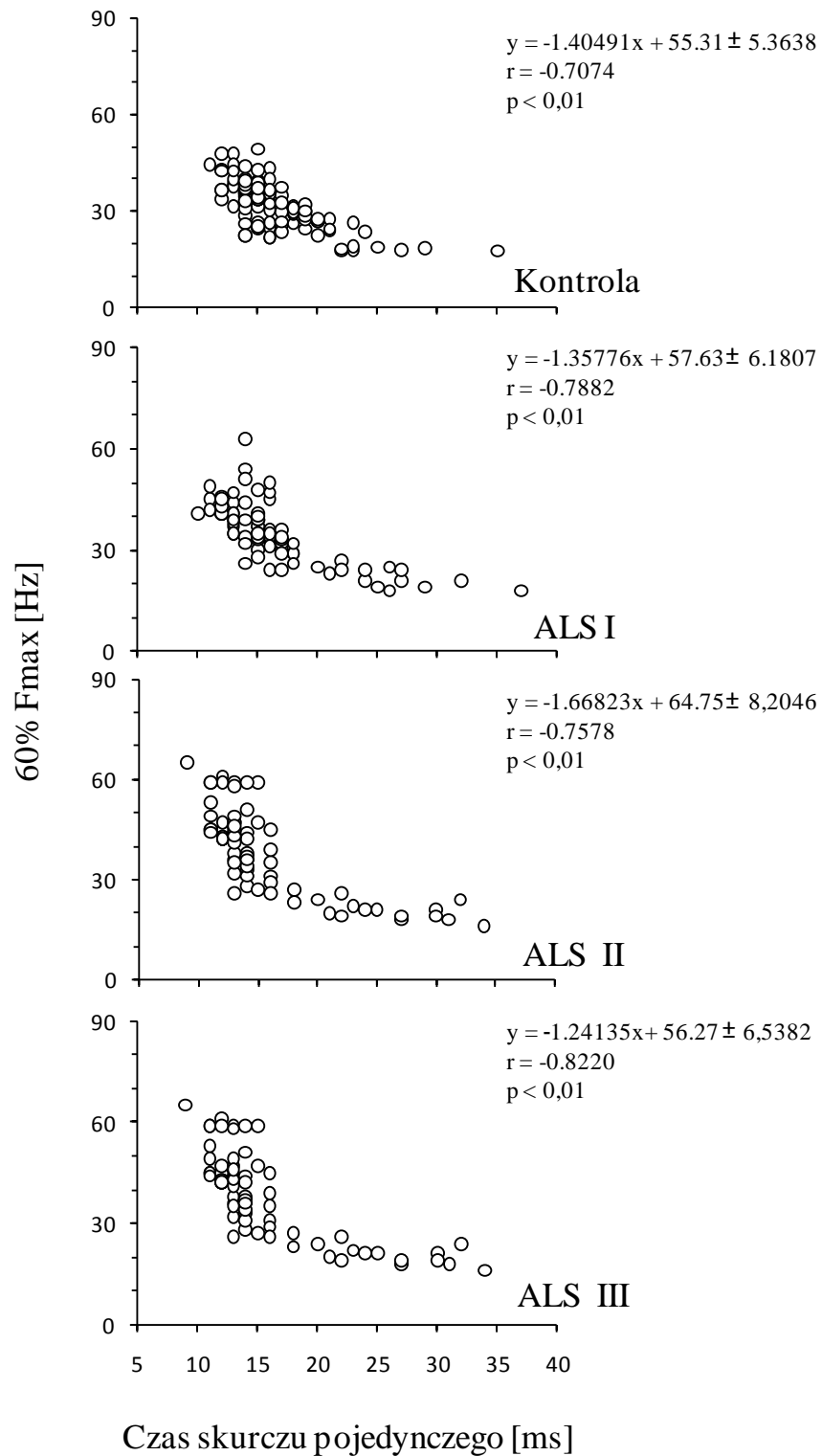


Rys. 24. Średnie wartości częstotliwości (Hz), przy których poszczególne typy jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) osiągają 60% siły maksymalnej dla grupy kontrolnej (C) i trzech grup zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnicy pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallis).



Rys. 25. Średnie wartości nachylenia krzywej siła – częstotliwość dla poszczególnych typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ - poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

We wszystkich grupach badawczych stwierdzono istotne ($p < 0,01$) ujemne korelacje pomiędzy częstotliwością pobudzeń, przy której generowane jest 60% siły maksymalnej, a czasem skurczu pojedynczego (rys. 26).



Rys. 26. Zależność między czasem skurczu a częstotliwością, przy której poszczególne jednostki ruchowe osiągają 60% siły maksymalnej dla grupy kontrolnej i trzech grup zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). Na wykresach zaznaczono równanie regresji, współczynnik korelacji porządku rang Spearmana (r) oraz jego istotność.

4.6. Cechy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych

Podstawowe cechy potencjałów czynnościowych trzech typów jednostek ruchowych (FF, FR i S) w poszczególnych grupach zostały przedstawione odpowiednio w tab. 6, 7 i 8.

Tab. 6. Podstawowe wartości cech potencjałów czynnościowych (wartości średnie \pm SD i zakresy) jednostek ruchowych typu FF w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II I ALS III).

Latencja – czas od momentu pobudzenia rozdzielonych korzeni brzusznych do pojawienia się potencjału czynnościowego, amplituda - wartość mierzona od minimalnego do maksymalnego wychylenia zapisu potencjału czynnościowego, czas trwania - mierzony od początku do końca aktywności elektrycznej jednostki, czas +/- - czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału, fazy – liczba faz potencjału czynnościowego, zwroty – liczba zwrotów potencjału czynnościowego.

* - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; § - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

Grupa	Latencja [ms]	Amplituda [mV]	Czas trwania [ms]	Czas +/- [ms]	Fazy	Zwroty
Jednostki typu FF						
Kontrola	2,42 \pm 0,20 (1,96-2,71)	1,02 \pm 1,34 (0,04-4,67)	4,05 \pm 1,15 (1,89-7,44)	1,16 \pm 0,68 (0,49-3,98)	2,8 \pm 0,9 (2,0-5,0)	3,9 \pm 2,3 (2,0-11,0)
ALS I	2,71 \pm 0,58 (2,09-4,14)	0,87 \pm 0,86 (0,02-3,63)	3,73 \pm 0,97 (2,48-5,87)	1,17 \pm 0,54 (0,48-2,56)	2,8 \pm 0,8 (2,0-5,0)	4,1 \pm 1,7 (2,0-9,0)
ALS II	2,73 \pm 0,61 (1,94-3,75)	0,76 \pm 0,47 (0,02-1,67)	4,41 \pm 1,01 (2,66-6,04) §	1,36 \pm 0,60 (0,46-2,81)	2,5 \pm 0,7 (2,0-4,0)	3,5 \pm 1,6 (2,0-7,0)
ALS III	3,25 \pm 0,48 (2,01-3,76) *	0,91 \pm 0,63 (0,16-2,14)	4,41 \pm 1,44 (3,06-8,11)	1,29 \pm 0,39 (0,82-2,24)	2,8 \pm 0,8 (2,0-4,0)	5,1 \pm 2,5 (2,0-9,0)

Tab. 7. Podstawowe wartości cech potencjałów czynnościowych (wartości średnie \pm SD i zakresy) jednostek ruchowych typu FR w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II I ALS III).

Latencja – czas od momentu pobudzenia rozdzielonych korzeni brzusznych do pojawienia się potencjału czynnościowego, amplituda - wartość mierzona od minimalnego do maksymalnego wychylenia zapisu potencjału czynnościowego, czas trwania - mierzony od początku do końca aktywności elektrycznej jednostki, czas +/- - czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału, fazy – liczba faz potencjału czynnościowego, zwroty – liczba zwrotów potencjału czynnościowego.

** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; § - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

Grupa	Latencja [ms]	Amplituda [mV]	Czas trwania [ms]	Czas +/- [ms]	Fazy	Zwroty
Jednostki typu FR						
Kontrola	2,12 \pm 0,20 (1,63-2,94)	0,37 \pm 0,35 (0,01-1,69)	3,73 \pm 0,84 (2,31-5,68)	0,94 \pm 0,39 (0,40-2,23)	2,8 \pm 0,8 (2,0-5,0)	3,1 \pm 1,0 (2,0-6,0)
ALS I	2,71 \pm 0,53 (1,84-3,31) **	0,42 \pm 0,35 (0,01-1,39)	3,25 \pm 0,62 (2,54-5,66) **	1,15 \pm 0,43 (0,26-1,85)	2,8 \pm 0,9 (2,0-6,0)	3,3 \pm 1,3 (2,0-6,0)
ALS II	2,94 \pm 0,44 (2,05-3,48) **	0,31 \pm 0,37 (0,01-1,25)	3,51 \pm 0,33 (2,89-4,29)	1,35 \pm 0,42 (0,45-1,97) **	2,4 \pm 0,5 (2,0-3,0)	3,1 \pm 1,5 (2,0-7,0)
ALS III	2,90 \pm 0,38 (2,12-3,29) **	0,81 \pm 1,01 (0,09-3,41)	3,89 \pm 0,97 (1,79-5,91) §	0,98 \pm 0,33 (0,35-1,50)	2,3 \pm 0,6 (2,0-4,0)	4,2 \pm 2,0 (2,0-7,0)

Tab. 8. Podstawowe wartości cech potencjałów czynnościowych (wartości średnie \pm SD i zakresy) dla jednostek ruchowych typu S w grupie kontrolnej i trzech grupach zwierząt transgenicyjnych (ALS I, ALS II I ALS III).

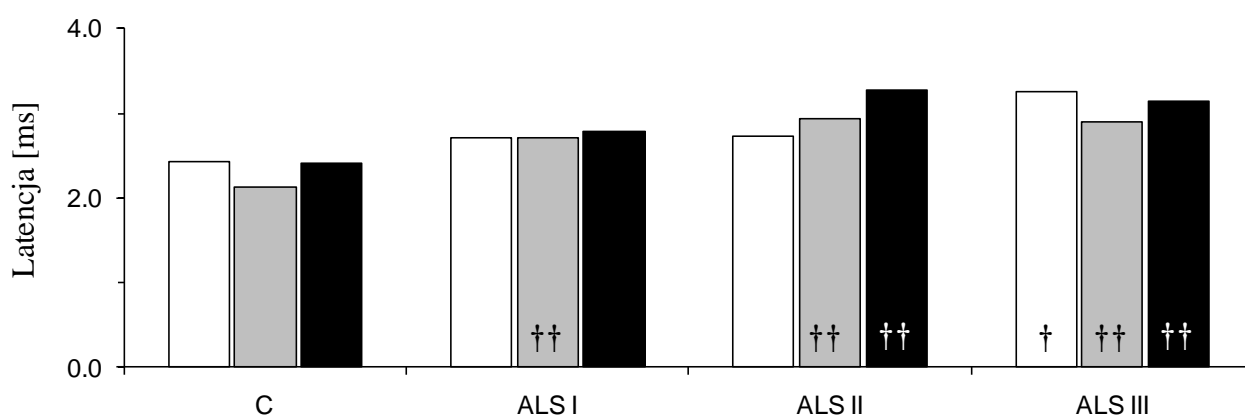
Latencja – czas od momentu pobudzenia rozdzielonych korzeni brzusznych do pojawienia się potencjału czynnościowego, amplituda - wartość mierzona od minimalnego do maksymalnego wychylenia zapisu potencjału czynnościowego, czas trwania - mierzony od początku do końca aktywności elektrycznej jednostki, czas +/- - czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału, fazy – liczba faz potencjału czynnościowego, zwroty – liczba zwrotów potencjału czynnościowego.

** - $p < 0,01$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej; § - $p < 0,05$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS I; †† - $p < 0,01$ – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy ALS II (ANOVA rang Kruskala-Wallisa).

Grupa	Latencja [ms]	Amplituda [mV]	Czas trwania [ms]	Czas +/- [ms]	Fazy	Zwroty
Jednostki typu S						
Kontrola	2,40 \pm 0,27 (2,04-2,84)	0,24 \pm 0,23 (0,01-0,67)	3,92 \pm 0,78 (2,92-5,19)	1,30 \pm 0,58 (0,49-2,14)	2,5 \pm 0,9 (2,0-5,0)	2,8 \pm 1,2 (2,0-5,0)
ALS I	2,79 \pm 0,58 (1,99-3,56)	0,31 \pm 0,22 (0,01-0,78)	3,96 \pm 1,09 (2,37-6,18)	1,26 \pm 0,50 (0,70-2,36)	2,6 \pm 0,6 (2,0-4,0)	2,9 \pm 1,1 (2,0-6,0)
ALS II	3,28 \pm 0,65 (2,15-5,18) **	0,22 \pm 0,20 (0,01-0,66)	4,40 \pm 1,06 (1,91-6,14)	1,50 \pm 0,52 (0,60-2,53)	2,6 \pm 0,6 (2,0-4,0)	3,3 \pm 1,3 (2,0-6,0)
ALS III	3,15 \pm 0,57 (2,43-4,07) **	0,95 \pm 1,03 (0,14-4,60) ** § ††	4,76 \pm 1,32 (2,68-7,02)	1,28 \pm 0,52 (0,77-2,54)	2,8 \pm 1,1 (2,0-6,0)	3,6 \pm 1,5 (2,0-6,0)

4.6.1. Latencja potencjałów czynnościowych

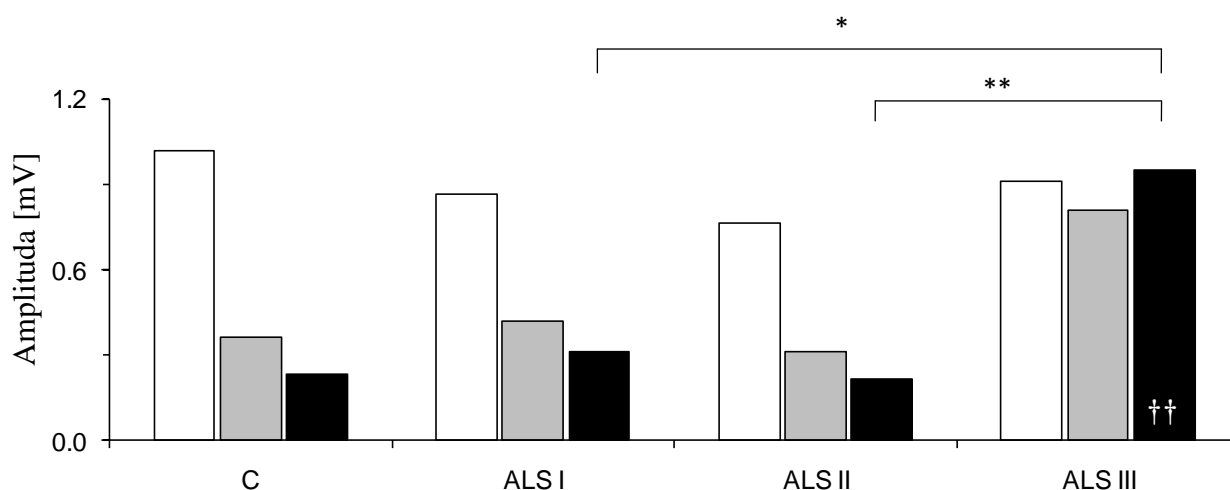
Latencja potencjałów czynnościowych jednostek ruchowych w kolejnych grupach zwierząt transgenicyjnych osiągała coraz wyższe wartości, przy czym obserwowano wydłużenie tego parametru w stosunku do grupy kontrolnej dla wszystkich typów jednostek. Ostatecznie, niezależnie od typu jednostek ruchowych, dla zwierząt w terminalnej fazie choroby (ALS III) latencja była ok 0.8 ms wyższa (o 34%, 37% i 31% odpowiednio dla jednostek typu FF, FR i S) niż dla zwierząt z grupy kontrolnej (rys. 27). Dla jednostek FF statystycznie wyższe wartości w odniesieniu do kontroli zaobserwowano dla grupy ALS III ($p < 0,05$), dla jednostek FR wszystkie grupy zwierząt transgenicyjnych istotnie różniły się od kontroli ($p < 0,01$), a dla jednostek S taka istotność występowała dla grup ALS II i ALS III ($p < 0,01$) (rys. 27).



Rys. 27. Średnie wartości latencji potencjałów czynnościowych dla trzech typów jednostek ruchowych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie zwierząt kontrolnych (C), oraz trzech grupach zwierząt transgenicyjnych (ALS I, ALS II, ALS III). †† - $p < 0,01$; † - $p < 0,05$ – poziom istotności różnic w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupkach (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

4.6.2. Amplituda potencjałów czynnościowych

Zmiany amplitudy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych były istotne statystycznie jedynie w odniesieniu do jednostek wolnych. W grupie ALS III notowano ponad czterokrotny wzrost średniej wartości amplitudy potencjału czynnościowego jednostek wolnych (statystycznie istotny w stosunku do grup kontrolnej i ALS II na poziomie $p < 0,01$; w stosunku do grupy ALS I na poziomie $p < 0,05$). Dla jednostek szybkich obu typów parametr ten nie zmieniał się znacząco, choć w grupie ALS III wartości amplitudy były wyższe w odniesieniu do kontroli, zarówno dla jednostek typu FF jak i FR (rys. 28).



Rys. 28. Średnie wartości amplitudy potencjałów czynnościowych dla trzech typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C), oraz trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II i ALS III). ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ – poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$ - poziom istotności różnicy w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupku (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

4.6.3. Czas trwania potencjałów czynnościowych

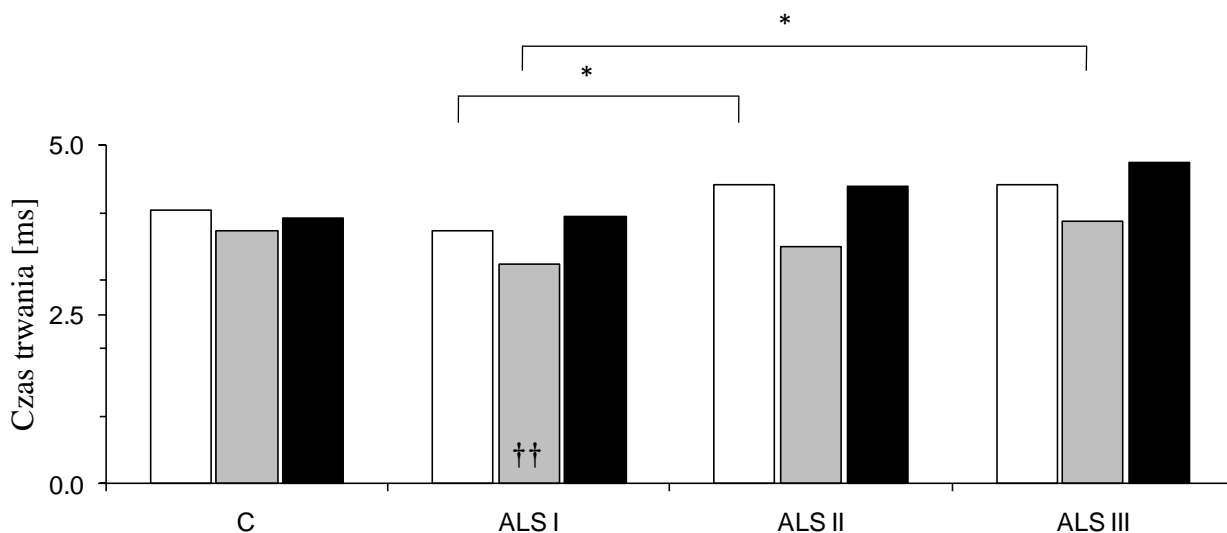
Czas trwania potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych typu FF zwierząt transgenicznych nie różnił się istotnie w żadnej z grup badawczych w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie ALS I parametr ten był niższy niż u zwierząt kontrolnych, a w grupach ALS II i ALS III wartości były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Statystycznie istotną różnicę czasu trwania potencjału czynnościowego jednostek FF zaobserwowano pomiędzy grupami ALS I i ALS II ($p < 0,05$) (rys. 29).

Dla jednostek FR w grupie ALS I czas trwania potencjału był krótszy w stosunku do kontroli ($p < 0,01$), w pozostałych grupach zwierząt transgenicznych wartości tego parametru nie różniły się istotnie od wartości kontrolnej. W grupie ALS III czas trwania osiągał wartości najwyższe i jednocześnie była to różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$) w odniesieniu do grupy ALS I, która charakteryzowała się najkrótszym czasem trwania potencjału czynnościowego (rys. 29).

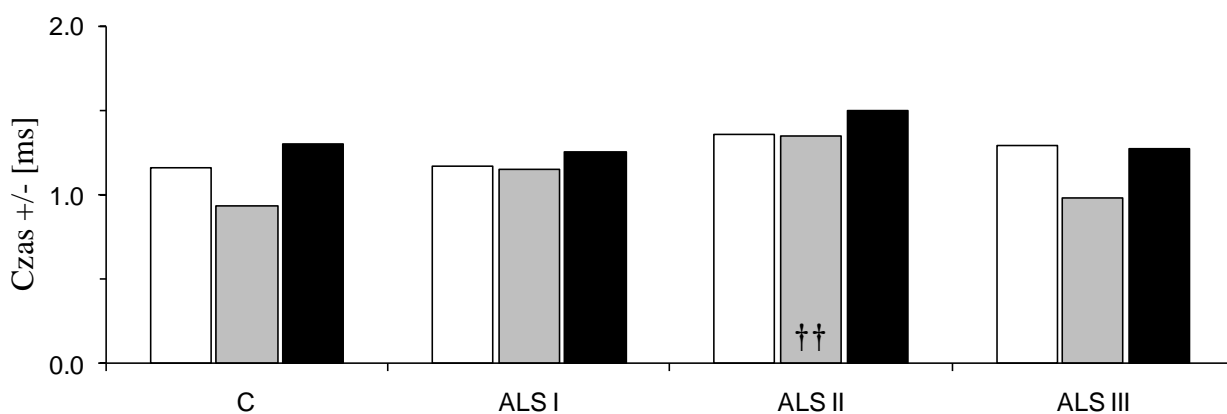
Czas trwania potencjałów czynnościowych jednostek S nie zmieniał się istotnie statystycznie w żadnej z badanych grup w porównaniu do kontroli, choć jego średnie wartości w grupach ALS I, ALS II i ALS III były wyższe od wartości kontrolnych (rys. 29).

4.6.4. Czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału czynnościowego

Czas pomiędzy maksymalnym i minimalnym wychyleniem potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych był istotnie statystycznie wyższy tylko dla jednostek FR w grupie ALS II w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$). W pozostałych grupach nie obserwowano znaczących różnic tego parametru zarówno w porównaniu z grupą kontrolną jak i pomiędzy grupami zwierząt transgenicznych (rys. 30).



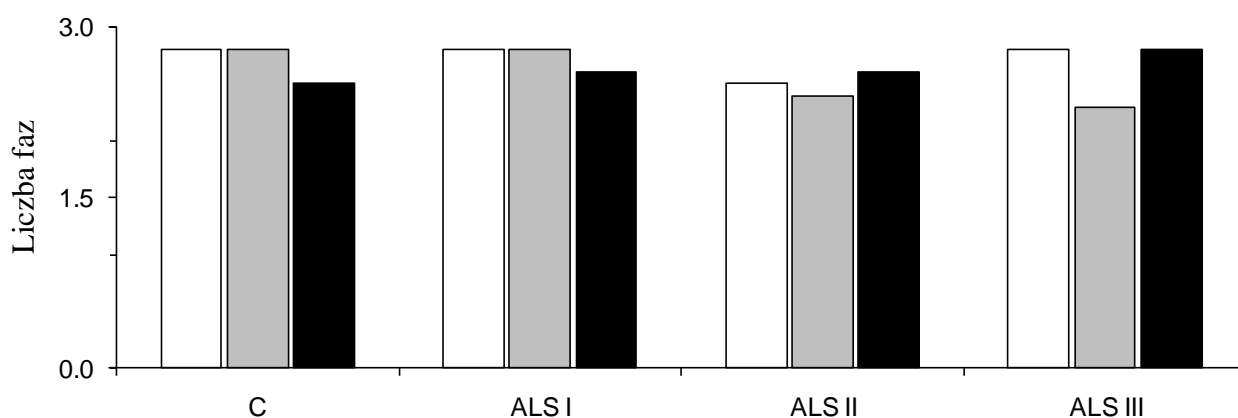
Rys. 29. Średnie wartości czasu trwania potencjału czynnościowego trzech typów jednostek ruchowych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie zwierząt kontrolnych (C), oraz trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II, ALS III). * - $p < 0,05$ - poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi grupami zwierząt transgenicznych, †† - $p < 0,01$ - poziom istotności różnicy w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupku (ANOVA rang Kruskala-Wallis).



Rys. 30. Średnie wartości czasu pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjałów czynnościowych (czas +/-) trzech typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) oraz w trzech grupach zwierząt transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną (ALS I, ALS II i ALS III). †† - $p < 0,01$ - poziom istotności różnicy w porównaniu z grupą kontrolną wskazany na słupku (ANOVA rang Kruskala-Wallis).

4.6.5. Liczba faz i zwrotów potencjałów czynnościowych

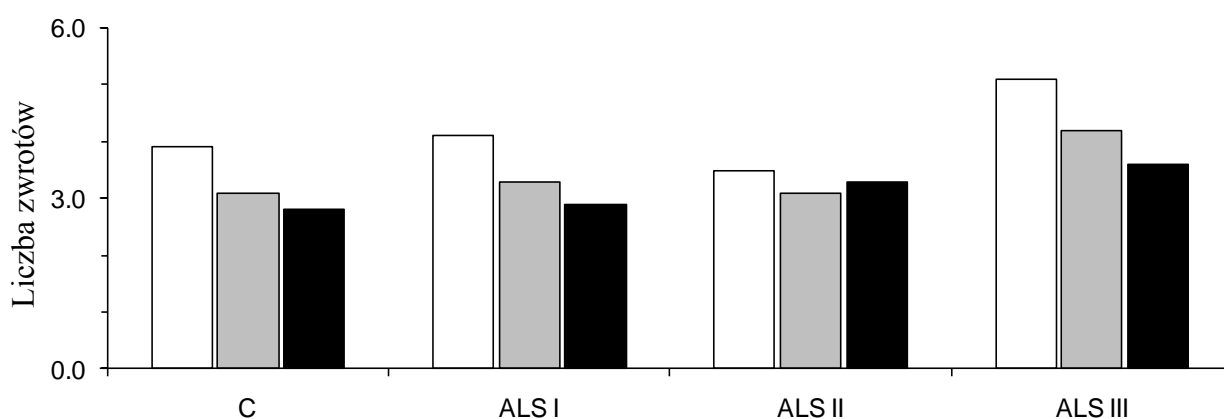
Kształty potencjałów czynnościowych jednostek ruchowych u badanych zwierząt okazały się być niezmiennie mimo rozwoju procesu chorobowego. Średnia liczba faz potencjałów czynnościowych nie różniła się istotnie u zwierząt transgenicznych, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt z ALS (rys. 31). Potencjały czynnościowe wszystkich typów jednostek motorycznych w poszczególnych grupach były głównie dwu-, trzyfazowe. Potencjały wielofazowe (mające ponad 4 fazy) pojawiały się sporadycznie we wszystkich grupach. Ich procentowy udział wynosił odpowiednio w grupach kontrolnej, ALS I, ALS II i ALS III: dla jednostek FF - 6%, 3%, 0%, 0%; dla jednostek FR – 5%, 6%, 0%, 0%; dla jednostek S – 8%, 0%, 0%, 12%;



Rys. 31. Średnia liczba faz potencjałów czynnościowych trzech typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) oraz w trzech grupach zwierząt transgenicznych (ALS I, ALS II i ALS III).

Średnia liczba zwrotów potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych także nie różniła się w badanych grupach, choć dla wszystkich typów jednostek w grupie ALS III

była ona wyższa niż w grupie kontrolnej (różnice statystycznie nieistotne). Podobnie jak w odniesieniu do liczby faz, nie stwierdzono statystycznych różnic liczby zwrotów, zarówno u zwierząt z ALS w stosunku do grupy kontrolnej, jak również pomiędzy grupami zwierząt transgenicyjnych (rys. 32). Procentowy udział potencjałów czynnościowych o większej liczbie zwrotów (powyżej 4) w kolejnych grupach (odpowiednio kontrolnej, ALS I, ALS II i ALS III) wynosił: dla jednostek FF – 19%, 41%, 29%, 45%; dla jednostek FR – 13%, 19%, 20%, 40%; dla jednostek S – 17%, 7%, 25%, 35%.



Rys. 32. Średnia liczba zwrotów potencjałów czynnościowych trzech typów jednostek motorycznych (FF – białe słupki, FR – szare słupki, S – czarne słupki) w grupie kontrolnej (C) oraz w trzech grupach zwierząt transgenicyjnych (ALS I, ALS II i ALS III).

5. Dyskusja

Prezentowana praca opisuje wyniki elektrofizjologicznych badań cech jednostek motorycznych szczurów transgenicznych, będących nosicielami genu $hmSOD1^{(G93A)}$, które uważa się obecnie za jeden z najlepszych zwierzęcych modeli ALS (Van Den Bosch, 2011). Równocześnie są to pierwsze badania prezentujące charakter, kierunek oraz tempo zmian cech jednostek ruchowych w trakcie rozwoju procesu chorobowego (badano zwierzęta w fazie bezobjawowej, z pierwszymi widocznymi objawami oraz w fazie końcowej choroby i porównywano je do zwierząt zdrowych). Przedstawione kompleksowe analizy zmian zachodzących w puli jednostek ruchowych w efekcie rozwoju ALS mają znaczenie dla zrozumienia procesów prowadzących do stopniowej utraty sprawności układu nerwowo-mięśniowego i ostatecznie paraliżu prowadzącego do śmierci.

5.1. Zmiany masy ciała i rozwój atrofii badanego mięśnia

We wszystkich grupach badawczych obserwowano niższą średnią masę ciała zwierząt z ALS w porównaniu do kontroli, ale największy spadek masy ciała notowano dla zwierząt z grupy ALS III. Nieznacznie wyższe średnie masy ciała w grupie ALS II w porównaniu do ALS I są prawdopodobnie związane z rozwojem osobniczym zwierząt, ponieważ zgodnie z charakterystyką rasy Sprague-Dawley dopiero ok. 14-16 tygodnia życia szczury osiągają maksymalną masę ciała (www.animalab.pl).

Spadek masy ciała jest przez wielu autorów podawany jako pierwsza możliwa do zaobserwowania zmiana u ludzi chorych na ALS (Adamek i Tomik, 2005; Murray i Mitsumoto, 2006; Dupuis i wsp., 2011), oraz na modelu zwierzęcym tej choroby (Derave i wsp., 2003; Dupuis i Loeffler, 2009). Redukcja masy ciała postępuje w kolejnych etapach choroby, co może być efektem hipermetabolizmu obserwowanego zarówno u pacjentów, jak i

na modelu zwierzęcym (Dupuis i wsp., 2008; Dupuis i Loeffler, 2009; Funalot i wsp., 2009; Dupuis i wsp., 2011), ale również stopniowego spadku liczby włókien mięśniowych w efekcie obumierania unerwiających je motoneuronów (Frey i wsp., 2000; Pun i wsp., 2006; Hegedus i wsp., 2007 i 2008; Gordon i wsp., 2010; Mancuso i wsp., 2011), czy wreszcie spadku masy samych włókien mięśniowych (Hegedus i wsp., 2008).

Średnia masa mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki zmieniała się w poszczególnych grupach w podobny sposób jak średnia masa ciała. Dla wszystkich grup zwierząt transgenicznych była niższa w porównaniu do kontroli, a najniższą średnią masę tego mięśnia obserwowano u zwierząt z grupy ALS III. Ubytek masy mięśni w przebiegu ALS również był cechą wielokrotnie obserwowaną i podawaną przez wielu autorów (Derave i wsp., 2003; Murray i Mitsumoto, 2006). Przyczyn spadku masy mięśnia należy upatrywać w takich samych mechanizmach jak te leżące u podłoża redukcji masy ciała. U zwierząt w końcowym etapie choroby (ALS III) zaobserwowano proporcjonalny spadek udziału jednostek typu FF, a więc prawdopodobnie ubytek przede wszystkim włókien mięśniowych typu FG o największej średnicy. Jednostki tego typu charakteryzują się zarazem najwyższym wskaźnikiem unerwienia (Kanda i Hashizume, 1992), dlatego ich zanik w dużej mierze wpływa na spadek masy mięśnia. Wiadomo, że część odnerwionych włókien mięśniowych ulega reinerwacji przez motoneurony pozostałych, nieuszkodzonych jednostek ruchowych, głównie typu S (Frey i wsp., 2000; Hegedus i wsp., 2007). Jest to jednak niewystarczający mechanizm zapobiegania utracie masy mięśnia, która nasila się w końcowym etapie choroby, gdyż liczba obumierających motoneuronów jest zbyt duża (Hegedus i wsp., 2007).

Należy również dodać, że tempo ubytku masy mięśnia i zmiany jego cech zależne są od typu i składu budujących mięsień jednostek motorycznych. W mięśniach szybkich atrofia pojawia się zdecydowanie wcześniej niż w mięśniach wolnych (Frey i wsp., 2000; Derave i wsp., 2003; Hegedus i wsp., 2007).

Procentowy stosunek masy mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki do masy ciała był niższy w grupie ALS III w stosunku do kontroli, natomiast nieco wyższy w grupach ALS I i ALS II. Zmiany tego wskaźnika podkreślają, że ubytek masy mięśni jest główną przyczyną ubytku masy ciała, a ponadto, że masa badanego mięśnia drastycznie spadła dopiero w końcowym etapie choroby, natomiast we wcześniejszych jej etapach prawdopodobnie procesy reinerwacji obocznej nie pozwoliły na tak gwałtowną redukcję masy mięśnia.

5.2. Proporcje jednostek motorycznych

Brak (jednostki S) lub obecność (jednostki F) objawu ugięcia przy częstotliwości drażnienia 40 Hz oraz charakterystyczny rozkład wartości czasu skurczu pojedynczego (z wartością graniczną 20 ms dla mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki u samców szczura), to cechy skurczu jednostek motorycznych, na podstawie których zwykle dokonuje się ich podziału na S i F (Grottel i Celichowski, 1990). Rozwój ALS u szczurów transgenicznych wiązał się z zaburzeniami rozkładu czasu skurczu pojedynczego poszczególnych typów jednostek ruchowych oraz zaburzeniami występowania objawu ugięcia (patrz wyniki 4.4.1. i 4.4.2. oraz rys. 7). Zmiany te rozwijały się najsilniej u zwierząt w końcowym etapie choroby (ALS III), dlatego zastosowanie u szczurów transgenicznych wymienionych cech skurczu do podziału jednostek ruchowych nie było skuteczne i pozostawiało część jednostek niesklasyfikowanych. Z tych względów do klasyfikacji jednostek na S i F dodatkowo wykorzystano indeks 20 Hz (Krutki i wsp., 2008a), który okazał się być skuteczną metodą podziału w grupie kontrolnej i w grupach zwierząt z ALS. Warto podkreślić, że ta metoda klasyfikacji jednostek na szybkie i wolne umożliwiła również podział jednostek ruchowych u zwierząt z całkowicie (Krutki i wsp., 2008a; Mrówczyński i wsp., 2010) lub częściowo (Celichowski i wsp., 2010) przeciętym rdzeniem kręgowym, których czas skurczu ulegał wydłużeniu i ujednoliceniu, a objaw ugięcia także zanikał.

We wszystkich czterech badanych grupach zwierząt w mięśni brzuchatym przyśrodkowym łydki na podstawie indeksu 20 Hz i wskaźnika zmęczenia można było wyróżnić trzy typy jednostek ruchowych. Istotne zmiany proporcjonalnego udziału poszczególnych typów jednostek ruchowych zaobserwowano dopiero w grupie zwierząt z pierwszymi objawami chorobowymi (ALS II), gdzie wykazano wyższy udział jednostek ruchowych typu FF i S z równoczesnym ograniczeniem liczby jednostek typu FR.

Według wielu autorów prowadzących badania na modelu ALS u myszy proces zaniku neuronów ruchowych w ALS ma charakter selektywny tzn. najbardziej wrażliwe są motoneurony duże, unerwiające jednostki ruchowe typu FF i to one obumierają jako pierwsze, jeszcze przed wystąpieniem widocznych objawów chorobowych. Następnie giną motoneurony jednostek ruchowych typu FR, natomiast najbardziej odporne na proces chorobowy są motoneurony najmniejsze, budujące jednostki typu S i to one przeżywają najdłużej (Frey i wsp., 2000; Pun i wsp., 2006; Hegedus i wsp., 2007 i 2008; Gordon i wsp., 2010; Mancuso i wsp., 2011).

Obserwowane zmiany proporcji jednostek w grupie ALS II, kształtują się jednak inaczej i mają bardzo podobny przebieg jak zmiany powstające w efekcie funkcjonalnego przeciążenia mięśni wywołanego przez chirurgiczne usunięcie mięśni dla nich synergistycznych (Olha i wsp., 1988) oraz po połowicznym przecięciu rdzenia kręgowego (Celichowski i wsp., 2010). Prawdopodobnie taki kierunek zmian transformacyjnych jest odpowiedzią układu nerwowo-mięśniowego na przeciążenie czynnych jednostek ruchowych. W przypadku ALS i częściowego uszkodzenia rdzenia, w wyniku ubytku pewnej liczby jednostek w mięśni pozostałe z nich są funkcjonalnie przeciążone (Celichowski i wsp., 2010; Gordon i wsp., 2010).

W końcowym etapie choroby (ALS III) obserwowano trzykrotnie wyższy proporcjonalny udział jednostek typu S kosztem mniejszego udziału jednostek FF i FR w

porównaniu do zwierząt zdrowych. Wyniki te zgodne były z obserwacjami innych autorów badających myszy SOD1 G93A, którzy wykazali, że synapsy nerwowo-mięśniowe włókien szybkiego typu są wysoce wrażliwe na proces chorobowy i giną jako pierwsze, a synapsy włókien wolnego typu pozostają niezmienione aż do końcowego okresu choroby (Frey i wsp., 2000). Podobnie wykazano, że aksony jednostek szybkich męczących się są zmienione chorobowo jeszcze przed pojawieniem się pierwszych widocznych symptomów ALS, natomiast aksony motoneuronów jednostek szybkich odpornych na zmęczenie wykazują zmiany dopiero w momencie pojawienia się pierwszych objawów choroby, podczas gdy aksony motoneuronów wolnych jednostek są relatywnie najbardziej odporne na uszkodzenie w procesie rozwoju ALS (Pun i wsp., 2006).

Hegedus i współautorzy (2007 i 2008), łącząc szacunkowe badania liczby jednostek ruchowych (metodą ITS-MUNE) z identyfikacją typów włókien mięśniowych opartą na badaniu ciężkich łańcuchów miozynowych w kolejnych stadiach rozwoju choroby na modelu ALS u myszy, również wykazali selektywność procesu chorobowego, w pierwszej kolejności powodującego zanik największych jednostek typu FF, a oszczędzającego najmniejsze jednostki ruchowe typu S. Badania elektrofizjologiczne (badanie przewodnictwa nerwowego, szacunkowe badania liczby jednostek, badanie odruchu H, badanie potencjałów wywołanych) przeprowadzone na modelu ALS u myszy potwierdzają większą wrażliwość na proces chorobowy motoneuronów największych w porównaniu do motoneuronów małych (Mancuso i wsp., 2011). Mniejszy procentowy udział jednostek ruchowych FF w grupie ALS III może być efektem selektywnego obumierania motoneuronów jednostek tego typu, ale również transformacji części z nich do jednostek typu FR (Hegedus i wsp., 2007 i 2008).

Podobnie wzrastająca w kolejnych grupach proporcja jednostek ruchowych typu S oraz przewaga tego typu jednostek w badanych mięśniach zwierząt z grupy ALS III może dowodzić, że to właśnie te jednostki o najmniejszych motoneuronach są relatywnie

najbardziej odporne i przeżywają najdłużej w trakcie postępu choroby. Zmiana proporcji jednostek może być również wyrazem transformacji jednostek szybkich w kierunku wolnych jako odpowiedzi na zwiększoną aktywność i w efekcie ich przeciążenie (Celichowski i wsp., 2010; Gordon i wsp., 2010). Należy też dodać, że w mięśniach wolnych, w których przeważają jednostki ruchowe wolne (np. mięsień płaszczkowaty), atrofia i zmiany cech skurczu pojawiają się zdecydowanie później niż w mięśniach szybkich (np. mięsień piszczelowy przedni) (Frey i wsp., 2000; Derave i wsp., 2003; Hegedus i wsp., 2007). Jest to dowodem, że to właśnie jednostki typu S są najmniej podatne na uszkodzenie i przeżywają najdłużej w trakcie rozwoju choroby.

5.3. Cechy skurczu jednostek motorycznych

5.3.1. Parametry czasowe skurczu

Zmiany parametrów czasowych skurczu jednostek ruchowych (czasu skurczu i czasu połowicznego rozkurczu) dotyczyły tylko jednostek szybkich obu typów. Średnie wartości czasu skurczu jednostek szybkich były we wszystkich grupach zwierząt z ALS krótsze (z wyjątkiem jednostek FR grupy ALS III, gdzie czas skurczu był dłuższy) w stosunku do zdrowych zwierząt kontrolnych. Dla obu typów szybkich jednostek najkrótszy czas skurczu notowany był w grupie ALS II. Czas połowicznej relaksacji obu typów jednostek szybkich w grupach ALS I i ALS II był krótszy w stosunku do kontroli, a w grupie ALS III – dłuższy. Zmiany parametrów czasowych skurczu prawdopodobnie mają podłoże w zmianach tempa uwalniania jonów wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej do sarkoplazmy i powrotnego ich wychwytywania, ale mogą być również związane z innymi zachodzącymi procesami transformacyjnymi. Wydłużenie czasu skurczu i czasu połowicznego rozkurczu dla jednostek szybkich w grupie ALS III może wynikać ze znacznego ograniczenia lokomocji u szczurów

tej grupy, bowiem dłuższy czas skurczu i połowicznej relaksacji wykazano również między innymi po częściowym, jak i całkowitym uszkodzeniu rdzenia kręgowego (Celichowski i wsp., 2006; Celichowski i wsp., 2010; Mrówczyński i wsp., 2010), czy w procesie starzenia się organizmu (Łochyński i wsp., 2008). Derave i współautorzy (2003), badając na modelu ALS u myszy między innymi parametry skurczu dwóch mięśni: wolnego (płaszczkowatego) i szybkiego (prostownika długiego palców), wykazali w obu przypadkach wydłużenie czasu skurczu oraz czasu połowicznego rozkurczu. Należy jednak zaznaczyć, że pomiar przeprowadzany był w warunkach „*in vitro*”, na całym mięśniu i tylko w dwóch terminach: na myszach 90-dniowych (65% przewidywanego czasu przeżycia) i 120-dniowych (85% przewidywanego czasu przeżycia), co może być przyczyną odmiennych wyników.

5.3.2. Zmiany zależności siły skurczu od częstotliwości drażnienia

Najbardziej dynamiczne modyfikacje mechanizmów stopniowania siły skurczu, poprzez zmiany częstotliwości pobudzeń, w przebiegu ALS dotyczyły jednostek szybkich, natomiast procesy regulacji siły jednostek wolnych istotnie się nie zmieniały. Wiązać to należy przede wszystkim ze zmianami parametrów czasowych skurczów pojedynczych, które są jednym z czynników warunkujących sumowanie się pojedynczych skurczów w skurcze tężcowe i w związku z tym mają wpływ na przebieg oraz kształt krzywych zależności siły od częstotliwości drażnienia (Kernell i wsp., 1975 i 1983; Celichowski i Grottel, 1997; Mrówczyński i wsp., 2006). Im dłuższe czasy skurczu i połowicznego rozkurczu jednostki motorycznej, tym niższy jest zakres częstotliwości przy których powstają skurcze tężcowe niepełne. Dlatego strome części krzywych siła-częstotliwość wykreślone dla jednostek wolnych (o dłuższych czasach skurczu i połowicznej relaksacji) przebiegają na wykresie lewostronnie w stosunku do krzywych wykreślonych dla jednostek szybkich (z krótszymi czasami skurczu i połowicznej relaksacji).

W związku ze skróceniem parametrów czasowych skurczu jednostek FF zwierząt transgenicznych, dla tych jednostek nastąpiło spodziewane przesunięcie krzywych siła-częstotliwość stymulacji w stronę prawą (w kierunku wyższych częstotliwości) w stosunku do krzywej wykreślonej dla jednostek FF grupy kontrolnej. Ponieważ najkrótszy średni czas skurczu notowany był dla jednostek FF w grupie ALS II, to właśnie w tej grupie krzywa siła-częstotliwość przesuniętą była najbardziej w prawą stronę. Krzywe siła-częstotliwość dla jednostek FR w grupie ALS I i ALS II zgodnie ze zmianami parametrów czasowych skurczu (skrócenie) przesuwały się również w stronę wyższych częstotliwości drażnienia w stosunku do krzywej wykreślonej dla jednostek FR grupy kontrolnej (najbardziej w prawo przesunięta była krzywa dla grupy ALS II).

Takie przesunięcie krzywych siła-częstotliwość może wiązać się również z obserwowanym w tych grupach niższym stosunkiem siły skurczu pojedynczego do siły skurczu tężcowego. Skutkiem tego typu zmian jest mniej efektywne sumowanie sił skurczów pojedynczych w skurcze tężcowe i wówczas skurcze tężcowe o tym samym stopniu wypełnienia (a zarazem o określonym poziomie siły) wymagają wyższych częstotliwości stymulacji niż u zwierząt zdrowych (60% siły maksymalnej osiągnane jest przy wyższych częstotliwościach stymulacji). Z tymi obserwacjami wiąże się wyższa częstotliwość wyładowań motoneuronów obserwowana w badaniach hodowli organotypowych transgenicznych myszy z ALS (Pieri i wsp., 2003; Kuo i wsp., 2004). Prawdopodobnym mechanizmem leżącym u podłoża tego typu zmian w grupie ALS II jest transformacja części jednostek FR w kierunku FF i zwiększony odsetek najszybszych jednostek FF. Pomimo mniej skutecznego procesu sumowania skurczów dla jednostek FF, w kolejnych grupach zwierząt z ALS nachylenie krzywej w jej najbardziej stromym zakresie (funkcjonalnie najważniejszym) zwiększało się. Oznacza to, że przyrost siły w tym zakresie przy wzroście częstotliwości wyładowań motoneuronów zachodzi w szybszym tempie niż u zwierząt zdrowych.

W grupie ALS III przebieg krzywej dla jednostek FR niemal pokrywał się z krzywą dla jednostek grupy kontrolnej. Wynik ten może wiązać się z procesami transformacji części jednostek typu FF do puli jednostek typu FR w efekcie ich zwiększonej aktywności (są rekrutowane częściej) oraz w efekcie wzrostu częstotliwości wyładowań motoneuronów (Hegedus i wsp., 2008). Może być również związany z reinerwacją odnerwionych włókien mięśniowych typu FG przez motoneurony jednostek typu FR. Taką możliwość reinerwacji sugerowali Hegedus i współautorzy (2008), w dyskusji o selektywności procesu chorobowego. Z drugiej strony wykazano, że możliwości motoneuronów tych jednostek w zakresie reinerwacji obocznej są niewielkie (Frey i wsp., 2000). Włókna mięśniowe FG, które uległy reinerwacji przez motoneurony innego typu niż FF prawdopodobnie zachowują część swoich cech skurczu i stąd skrócenie czasu skurczu oraz połowicznej relaksacji, a także przesunięcie krzywych siła-częstotliwość w stronę niższych częstotliwości drażnienia.

Wzrost nachylenia krzywych siła-częstotliwość obserwowano w odniesieniu do jednostek szybkich typu FF. Wskazuje to z jednej strony na większy przyrost sił przy wzroście częstotliwości wyładowań motoneuronów, a jednocześnie na ograniczenie zakresu częstotliwości wyładowań motoneuronów odpowiadających skurczom tężcowym niepełnym, których siła może być sterowana. Funkcjonalnym następstwem pogorszenia takiego sterowania może być mniejsza precyzja ruchów wielokrotnie obserwowana u pacjentów chorych na ALS (Adamek i Tomik, 2005; Wijesekera i Leigh, 2009).

Przebieg krzywych siła-częstotliwość jednostek wolnych u zwierząt transgenicznych nie różnił się istotnie w porównaniu do krzywych wykreślonych dla jednostek wolnych w grupie kontrolnej. Jedynie w grupie ALS III obserwowano istotny wzrost siły skurczu pojedynczego, co modyfikowało początkowy odcinek krzywej omawianej zależności. Nachylenie krzywych dla jednostek S mało (istotnie niższą wartość notowano szczególnie w grupie ALS III), przez co krzywa ta upodabniała się do krzywych wykreślonych dla jednostek

szybkich. Wskazuje to także na procesy reinerwacji przez jednostki wolne odnerwionych włókien mięśniowych jednostek szybkich.

We wszystkich badanych grupach zwierząt transgenicznych zachowana została bardzo silna korelacja pomiędzy czasem skurczu a częstotliwością przy której jednostki ruchowe osiągają 60% siły maksymalnej. Taka korelacja obserwowana była u zwierząt zdrowych (Kernell i wsp., 1983; Mrówczyński i wsp., 2006). Uzyskany wynik wskazuje na dobrą organizację puli jednostek motorycznych, mimo postępu procesu chorobowego. Być może jest to związane z rozciągnięciem rozwoju choroby w czasie i jej stopniowym postępem. W takich warunkach jednostki ruchowe mają czas na adaptację do zmieniających się warunków aktywności. Takiej adaptacji nie obserwowano w ostrych urazach, jak np. uszkodzenie rdzenia kręgowego (Mrówczyński i wsp., 2011).

Należy również zaznaczyć, że na przebieg krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń wpływ mają nie tylko parametry czasowe skurczu pojedynczego, ale mogą je modyfikować także biomechaniczne właściwości mięśnia, wskaźnik unerwienia oraz przestrzenne rozmieszczenie włókien mięśniowych (Mrówczyński i wsp., 2006; Pogrzebna, 2007; Mrówczyński i wsp., 2011), które w trakcie rozwoju ALS również się zmieniają.

5.3.3. Siła skurczu pojedynczego i tężcowego

Średnia wartość siły skurczu pojedynczego jednostek typu FF we wszystkich grupach zwierząt transgenicznych była niższa w stosunku do średniej wartości dla zwierząt kontrolnych (różnica istotna statystycznie jedynie dla grupy ALS II). Podobne obserwacje poczyniono w odniesieniu do siły jednostek szybkich w mięśniach piszczelowym przednim oraz brzuchatym przyśrodkowym łydki na modelu ALS u myszy (Hegedus i wsp., 2008). Spadek średniej wartości sił jednostek FF może wynikać z faktu, że mimo wzrostu proporcjonalnego udziału tego typu jednostek w grupie ALS II, najsilniejsze z jednostek typu

FF (jednocześnie, z największymi motoneuronami) degenerują. Wzrost procentowego udziału jednostek typu FF w grupie ALS II, może również być przyczyną spadku wartości siły skurczu jednostek FF w tej grupie, bowiem najprawdopodobniej wzrost ten jest rezultatem transformacji części jednostek typu FR (o niższych wartościach sił) do puli jednostek FF. Spadek siły skurczu może wynikać także ze spadku średnicy włókien mięśniowych, szczególnie typu FG, oraz spadku siły generowanej przez pojedyncze włókna mięśniowe (Hegedus i wsp., 2008). Prawdopodobnie wszystkie te procesy współwystępują i nakładają się na siebie.

Jednostki wolne zwierząt transgenicznych wykazywały istotne zmiany siły skurczu pojedynczego tylko w grupie ALS III, w której parametr ten był niemal trzykrotnie wyższy w porównaniu do kontroli. W badaniach Hegedus i współautorów (2008) jednostki wolne mięśnia piszczelowego przedniego oraz brzuchatego przysródkowego łydki myszy z objawami ALS również charakteryzowały się wyższymi siłami skurczu. Zmiana ta wynika z faktu reinerwacji przez motoneurony jednostek wolnych głównie szybkich włókien mięśniowych odnerwionych w procesie chorobowym (Frey i wsp., 2000; Hegedus i wsp., 2007). Procesy reinerwacji zwiększają liczbę włókien mięśniowych budujących daną jednostkę i w konsekwencji zwiększa się jej siła, a także wzrasta stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego. Dowodzą tego wyniki badań częściowo odnerwionych mięśni, w których wykazano, że jednostki wolne reinerwujące odnerwione włókna mięśniowe charakteryzowały się wyższymi siłami skurczu pojedynczego oraz, w mniejszym zakresie, również tężcowego, a w konsekwencji wyższym stosunkiem siły skurczu pojedynczego do tężcowego (Gardiner i wsp., 1987). Wykazano także, że wartość stosunku siły skurczu pojedynczego do tężcowego koreluje z siłą skurczu jednostek ruchowych, ściśle zależną od wskaźnika unerwienia (Kanda i Hashizume, 1992; Celichowski i Grottel, 1993). W literaturze podkreślano wielokrotnie, że to właśnie motoneurony jednostek motorycznych typu S nie

tylko są najbardziej odporne na degenerację, ale także są najbardziej plastyczne i odpowiadają za procesy reinerwacji (Frey i wsp., 2000; Pun i wsp., 2006; Hegedus i wsp., 2007 i 2008; Gordon i wsp., 2010; Mancuso i wsp., 2011).

Zmiany stosunku siły skurczu pojedynczego do tężcowego pozwalają także na wyciągnięcie pośrednich wniosków w odniesieniu do jednostek typu FF. Dla jednostek FF zwierząt transgenicznych, szczególnie grup ALS II i ALS III wskaźnik ten był znacznie niższy niż w grupie kontrolnej, co sugeruje spadek średniej wartości wskaźnika unerwienia przeżywających jednostek ruchowych i potwierdza, że największe jednostki typu FF giną.

Zdolność do potężowego wzmocnienia siły skurczu jednostek motorycznych jest odwrotnie proporcjonalna do ich czasu skurczu. Siła skurczu pojedynczego jednostek szybkich wzmacnia się po każdej aktywności, natomiast jednostki wolne nie wykazują takiego wzmocnienia (Krarup, 1981). Dla jednostek wolnych istotną zmianę zdolności do wzmocnienia siły skurczu zaobserwowano tylko w grupie ALS III, gdzie była ona większa niż w grupie kontrolnej. Zmiana ta ponownie wskazuje na reinerwację przez motoneurony jednostek wolnych odnerwionych włókien mięśniowych jednostek szybkich, które charakteryzują się zdolnością do wzmacniania siły skurczu i częściowo tę cechę zachowują po reinerwacji.

5.3.4. Objaw ugięcia

U zwierząt z ALS część jednostek FF i FR nie posiadała objawu ugięcia, cechy typowej dla skurczów tężcowych niepełnych jednostek szybkich (Burke i wsp., 1973; Grottel i Celichowski, 1990). Objaw ugięcia w skurczach tężcowych niepełnych jest wynikiem wyjątkowo efektywnego sumowania kilku początkowych skurczów pojedynczych w skurcze tężcowe (Celichowski i wsp., 2005). Zanik tego objawu u części jednostek szybkich utrudnił ich klasyfikację w oparciu o tę cechę.

Głębokie modyfikacje cech skurczu charakterystycznych dla jednostek szybkich (jak opisane w poprzednich podrozdziałach zmiany parametrów czasowych i siłowych), skutkujące między innymi zanikiem objawu ugięcia, świadczą o tym, że jednostki tego typu są bardziej narażone na zwyrodnienie w procesie rozwoju choroby niż jednostki typu S. Podobne zmiany obserwowano jako wynik procesów reinerwacji po uszkodzeniu nerwów obwodowych (Rafuse i Gordon, 1998) oraz po uszkodzeniach rdzenia kręgowego (Celichowski i wsp., 2010; Mrówczyński i wsp., 2010). U podłoża tych zmian mogą leżeć zaburzenia cyrkulacji jonów wapnia pomiędzy sarkoplazmą a siateczką sarkoplazmatyczną gdyż, jak sugerują niektórzy badacze, pojawianie się objawu ugięcia w jednostkach szybkich jest związane z szybszym uwalnianiem i następnie wychwytywaniem jonów wapnia w siateczce sarkoplazmatycznej (Rafuse i Gordon, 1998).

5.3.5. Odporność na zmęczenie

U zwierząt transgenicznych, począwszy od grupy ALS I, zanikało typowe dla zwierząt zdrowych bimodalne rozłożenie wartości wskaźnika zmęczenia (następowało stopniowe ujednocianie populacji jednostek ruchowych pod względem odporności na zmęczenie). Odporność na zmęczenie odpowiada średniej aktywności jednostek ruchowych – jest tym wyższa, im bardziej są one aktywne. Obserwowane zmiany rozkładu odporności na zmęczenie są odpowiedzią układu nerwowo-mięśniowego na nowe potrzeby, jakie stwarza poruszanie się zwierząt w warunkach coraz mniejszej liczby zachowanych, zdrowych jednostek ruchowych. Tego typu zmiany opisano również w przypadku częściowo odnerwionych mięśni (Rafuse i Gordon, 1998). Średnia wartość wskaźnika zmęczenia dla jednostek typu FR i S była niższa we wszystkich grupach zwierząt transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną, a szczególnie w grupie ALS III.

Prace badające odporność na zmęczenie zarówno u zwierząt z ALS, jak i u pacjentów koncentrowały się na odporności całych mięśni i wyniki ich nie są zgodne. Jedne wykazywały wzrost odporności na zmęczenie (Derave i wsp., 2003), inne natomiast pogorszenie tej odporności (Sharma i wsp., 1995; Sharma i Miller, 1996). Wydaje się, że duże znaczenie może mieć etap rozwoju procesu chorobowego. U zwierząt z grupy ALS II obserwowano jeszcze stosunkowo dużo jednostek ruchowych o niskim wskaźniku zmęczenia, które normalnie angażowane są do szybkich ruchów typu bieg i skok, co świadczy o tym, że ograniczenia w odniesieniu do lokomocji u zwierząt z tej grupy były niewielkie. W grupie ALS III natomiast obserwowano głównie te jednostki, które angażowane są w ruchach niezbędnych do funkcjonowania organizmu (pozwalających zapewnić zaspokojenie podstawowych potrzeb życiowych), natomiast te o małej odporności na zmęczenie zanikały. Pewien spadek odporności na zmęczenie jednostek wolnych w tej grupie może być również wynikiem reinerwacji przez te jednostki odnerwionych włókien mięśniowych jednostek szybkich, charakteryzujących się niższą odpornością na zmęczenie, lub transformacji niektórych jednostek szybkich w kierunku wolnych w wyniku ich włączenia do aktywności tonicznej (antygrawitacyjnej).

Należy podkreślić, że to funkcja mięśnia warunkuje skład procentowy i cechy budujących ten mięsień jednostek motorycznych. Być może preferencyjny ubytek jednostek typu FF wiąże się również ze zmianą sposobu pracy mięśnia i jego jednostek w odpowiedzi na ograniczoną aktywność. W efekcie silne, mało odporne jednostki FF, są niemal nieużywane i z tego powodu giną jako pierwsze. Spadek odporności na zmęczenie może mieć także swoje źródło w kilku innych czynnikach. Proponowano m.in. zaburzoną funkcję motoneuronów, jak również czynniki mięśniowe, takie jak zmiany w sprzężeniu elektro-mechanicznym czy zasobach energetycznych mięśnia (Sharma i wsp., 1995; Sharma i Miller, 1996).

5.4. Cechy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych

Rolą badań elektromiograficznych w rozpoznawaniu ALS jest diagnozowanie nieprawidłowości dolnego neuronu ruchowego i wykluczenie innych schorzeń (Benatar, 2006). Rozpoznanie ALS u ludzi obecnie opiera się na kryteriach z 1998 roku (El Escorial, 1998), w których jednym z kryteriów opartych na badaniach elektromiograficznych i świadczących o procesie odnerwienia włókien mięśniowych są potencjały czynnościowe jednostek ruchowych o wysokiej amplitudzie i o wydłużonym czasie trwania, ze zwiększonym odsetkiem potencjałów wielofazowych (Brooks i wsp., 2000).

5.4.1. Latencja potencjałów czynnościowych

Latencja potencjałów czynnościowych jednostek ruchowych wszystkich typów w kolejnych grupach zwierząt transgenicznych osiągała coraz wyższe wartości. Wydłużenie latencji jest cechą typową dla ALS (Inghilleri i Iacovelli, 2011), skorelowaną z poziomem osłabienia mięśni i wiąże się ze spadkiem prędkości przewodzenia włókien nerwowych (aksonów motoneuronów) (Emeryk-Szajewska i wsp., 1998; Alves i wsp., 2011; Inghilleri i Iacovelli, 2011; Mancuso i wsp., 2011) i/lub przewodnictwa w płycie motorycznej. Te zmiany mogą być efektem utraty zmielinizowanych ruchowych włókien nerwowych, atrofii aksonów, wtórnych zmian osłonek mielinowych oraz przewagi w nerwie cienkich aksonów reinerwujących włókna mięśniowe (de Carvalho i Swash, 2006). Należy podkreślić, że zmiany latencji pojawiały się już u zwierząt w okresie przedobjawowym choroby (ALS I), gdy nie było jeszcze zmian cech skurczu jednostek ruchowych, co wskazuje na pierwotnie nerwowy charakter ALS.

5.4.2. Amplituda potencjałów czynnościowych

Prezentowane badania wykazały, że statystycznie istotna zmiana amplitudy potencjałów czynnościowych obserwowana była jedynie w odniesieniu do jednostek wolnych z grupy ALS III (czterokrotny wzrost średniej wartości), a dla jednostek szybkich takiej istotności zmian nie zaobserwowano. W odniesieniu do jednostek typu FF warto podkreślić, że w grupach ALS II i ALS III maksymalne amplitudy potencjałów osiągały wartości ponad dwukrotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Amplituda potencjałów czynnościowych koreluje z siłą skurczu oraz wskaźnikiem unerwienia, dlatego wynik ten wskazuje, iż w procesie rozwoju ALS początkowo giną głównie silne jednostki FF. Z kolei wśród jednostek FR w grupie ALS III obserwowano przypadki jednostek o bardzo wysokich amplitudach potencjałów czynnościowych, co wskazuje, że co najmniej niektóre z tych jednostek mogą być aktywne w procesach reinerwacji obocznej. Wzrost amplitudy jest czynnikiem wskazującym przede wszystkim na większą liczbę włókien mięśniowych unerwianych przez motoneurony (większa gęstość włókien i/lub większe terytorium jednostki), czyli na procesy reinerwacji przez jednostki zdrowe odnerwionych włókien mięśniowych. Może także być wynikiem przerostu włókien mięśniowych (de Carvalho i Swash, 2006).

Wyższe amplitudy potencjałów czynnościowych są cechą charakterystyczną zmian neurogennych i obserwowane były u pacjentów z ALS (de Carvalho i wsp., 2009; Krarup, 2011). Wzrost amplitudy w odniesieniu do jednostek typu S świadczy o tym, że motoneurony właśnie tych jednostek ruchowych odpowiadają za procesy reinerwacji odnerwionych włókien mięśniowych. U człowieka nie ma możliwości określenia w badaniu elektromiograficznym typu jednostki, ale najczęściej badane są jednostki niskoprogowe, czyli prawdopodobnie właśnie typu S.

5.4.3. Czas trwania potencjałów czynnościowych i czas pomiędzy skrajnymi wychyleniami potencjału

Parametry czasowe potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych wszystkich typów, mimo niewielkich statystycznych różnic, wykazywały tendencję do wydłużania. Taka statystycznie niewielka istotność zmian może potwierdzać przypuszczenia, że zmiany amplitudy potencjałów czynnościowych są bardziej czułym wskaźnikiem zmian neurogennych niż czas ich trwania (Hausmanowa-Petrusewicz, 1999; de Carvalho i Swash, 2006). Dłuższe czasy trwania potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych mogą wynikać z wielu różnych czynników takich jak: dodatkowe, reinerwowane włókna mięśniowe, większe rozproszenie płytek motorycznych i występujące w nich opóźnienie oraz spowolnienie przewodzenia wzdłuż przedsynaptycznych odgałęzień aksonów ruchowych. Dodatkowo wzrost średnicy włókien mięśniowych, oprócz wpływu na amplitudę potencjału czynnościowego jednostki motorycznej, ma wpływ również na wydłużenie czasu jego trwania (Hausmanowa-Petrusewicz, 1999; de Carvalho i Swash, 2006).

5.4.4. Liczba faz i zwrotów potencjałów czynnościowych

Średnia liczba faz oraz średnia liczba zwrotów potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych w badanych grupach zwierząt transgenicznych nie różniła się istotnie od wartości notowanych w grupie kontrolnej. Badania elektromiograficzne pacjentów chorych na ALS najczęściej wykazywały wielofazowe potencjały czynnościowe jednostek ruchowych (de Carvalho i wsp., 2009; Krarup, 2011), będące wynikiem procesów reinerwacji. W mięśniu szczura nie uzyskano takich wyników prawdopodobnie ze względu na zdecydowanie mniejsze terytoria jednostek, a szczególnie rozległość strefy płytek motorycznych oraz znacznie niższe wskaźniki unerwienia w porównaniu do ludzi (Kanda i Hashizume, 1992). Należy jednak zaznaczyć, że mimo braku statystycznych różnic, odsetek potencjałów

wielofazowych wzrósł najwyraźniej dla jednostek typu S w grupie ALS III, co także sugeruje aktywność jednostek tego typu w procesie reinerwacji odnerwionych włókien mięśniowych. Równocześnie, u zwierząt transgenicznych grupy ALS III, potencjały czynnościowe jednostek wszystkich typów były bardziej nieregularne – znaczna część potencjałów miała zwiększoną liczbę zwrotów.

5.5. Znaczenie funkcjonalne wyników badań

Monitorowanie zmian cech jednostek motorycznych, począwszy od bezobjawowego okresu choroby, może dostarczyć ważnych klinicznych wskazówek dotyczących możliwie jak najwcześniejszego rozpoznawania ALS, tym samym może służyć wprowadzeniu możliwie najwcześniej programu leczenia i zrozumieniu w jaki sposób powinny działać nowe, testowane w ALS leki (Dadon-Nachum i wsp., 2011).

Potwierdzenie selektywności procesu chorobowego, który powoduje, że w pierwszej kolejności obumierają jednostki typu FF, następnie FR, a jednostki typu S przeżywają najdłużej i są relatywnie najbardziej odporne sugeruje, że powinny być podjęte dalsze badania w celu wyjaśnienia uwarunkowań odporności jednostek typu S na proces chorobowy (Frey i wsp., 2000). Znajomość tych uwarunkowań mogłaby stanowić podłoże badań nakierowanych na zmniejszenie podatności jednostek szybkich na procesy degeneracji w rozwoju ALS.

Brak do tej pory sukcesów w poszukiwaniach skutecznych biomarkerów ALS kieruje diagnozowanie tej choroby w kierunku innych metod, w tym nieinwazyjnego obrazowania czy elektromiografii igłowej. Jedną z najbardziej obiecujących technik jest ocena liczby jednostek motorycznych (MUNE) (Turner i wsp., 2009). W celu zastosowania tej metody w rozpoznaniu ALS niezbędna jest pogłębiona wiedza dotycząca szybkości i wzorca degeneracji jednostek ruchowych w przebiegu choroby, dlatego badania jednostek motorycznych mają tak duże znaczenie.

Badania zmian cech jednostek motorycznych mogą również mieć wpływ na planowanie ćwiczeń fizycznych pacjentów chorych na ALS. Jak dotąd dane na ten temat nie są zgodne nawet w kwestii, czy w ogóle aktywność fizyczna jest wskazana w tym schorzeniu, a jeśli tak, to w jakim zakresie, o jakiej intensywności i w którym momencie choroby. Największa odporność jednostek ruchowych typu S na procesy chorobowe oraz możliwa transformacja jednostek szybkich w kierunku wolnych sugeruje, że najbardziej korzystny poziom aktywności fizycznej to skurcze izometryczne mięśni w czasie ruchów posturalnych oraz te ćwiczenia, które odzwierciedlają pracę antygrawitacyjną mięśni (Gordon i wsp., 2010). Umiarkowany wysiłek fizyczny wydaje się mieć pozytywny wpływ na układ nerwowo-mięśniowy w czasie choroby (Dupuis i wsp., 2011), ale planowanie odpowiedniego poziomu aktywności fizycznej pacjentów nabiera szczególnego znaczenia w świetle badań wskazujących, że trening wytrzymałościowy o wysokiej intensywności przyspiesza spadek sprawności motorycznej i śmierć transgenicznych myszy z mutacją G93A w genie SOD1 (Mahoney i wsp., 2004).

5.6. Podsumowanie dyskusji

Wyniki prezentowanych badań prowadzonych na transgenicznym modelu ALS u szczura (hmSOD1 G93A) wykazały, że charakter zmian cech skurczu jednostek ruchowych w przebiegu choroby ma wyraźnie różniące się fazy. Cechy jednostek w trakcie rozwoju procesów patologicznych leżących u podłoża ALS zmieniały się dynamicznie i wielokierunkowo, a charakter, kierunek oraz tempo zmian zależne były od typu jednostki ruchowej oraz etapu choroby. Zaobserwowano, że w pierwszym okresie choroby (etap ALS I) zmiany występowały tylko w układzie nerwowym (w aksonach motoneuronów). W dalszym etapie (ALS II), obserwowano zmiany w układzie nerwowym oraz mięśniowym, które w odniesieniu do tkanki mięśniowej można zinterpretować jako odpowiedź na przeciążenie

czynnych jednostek ruchowych, a zmiany cech skurczu i proporcji dotyczyły jednostek szybkich, głównie FF. W ostatnim etapie choroby (ALS III), gdy rozwinął się już paraliż zwierzęcia, obserwowano zanik jednostek szybkich, zwłaszcza FF, i wyraźne zmiany cech skurczu oraz potencjałów czynnościowych jednostek typu S. Należy także podkreślić, że w trakcie rozwoju ALS cechy jednostek motorycznych różnych typów stopniowo upodabniały się do siebie, co powodowało pewne trudności w ich klasyfikacji.

Jednostki szybkie, szczególnie typu FF, w przebiegu choroby okazały się być w największym stopniu podatne na zwyrodnienie. Zmiany ich cech były najgłębsze (zmieniały się ich parametry czasowe i siłowe skurczów, przebieg krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń, zaburzeniu ulegał objaw ugięcia i zdolność do potężcowego wzmocnienia siły), a w ostatniej fazie choroby znacznie spadał ich proporcjonalny udział w całkowitej liczbie jednostek badanego mięśnia. Jednostki wolne lepiej przeżywają w procesie rozwoju choroby (procentowy udział jednostek wolnych rósł w kolejnych etapach choroby), a bardzo istotne zmiany ich cech wynikały z faktu, że to właśnie jednostki tego typu pod koniec procesu chorobowego efektywnie reinerwują odnerwione włókna mięśniowe jednostek szybkich. W ten sposób jednostki wolne nabierały niektórych cech charakterystycznych dla jednostek szybkich, jak zdolność do potężcowego wzmocnienia siły, wyższa siła skurczu pojedynczego i tężcowego, wyższy stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego, większe nachylenie krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń oraz spadek odporności na zmęczenie. Należy podkreślić, że transformacja włókien mięśniowych, które reinerwowane są przez motoneuron innego typu niż pierwotnie, wymaga czasu i nie jest całkowita, a reinerwowane włókna mięśniowe zachowują część swoich cech. Wyraźnie zaznaczone zmiany cech skurczu jednostek ruchowych obserwowane były dopiero w grupie ALS II, ale już w okresie przedobjawowym (ALS I) spadała prędkość przewodzenia aksonów (wydłużała się latencja potencjałów czynnościowych jednostek ruchowych), co wskazuje, że

pierwotny patologiczny proces w ALS nie dotyczy włókien mięśniowych, ale ma swoje źródło w układzie nerwowym.

6. Wnioski

1. Ubytek masy ciała oraz masy mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki w trakcie rozwoju ALS u szczurów transgenicznych (hmSOD1 G93A) wiąże się prawdopodobnie ze stopniowym ubytkiem liczby włókien mięśniowych w efekcie ich odnerwienia.
2. Wyższy udział jednostek ruchowych typu FF i S w grupie zwierząt z pierwszymi objawami ALS w porównaniu do grupy kontrolnej, prawdopodobnie jest efektem przeciążenia czynnych jednostek motorycznych, ponieważ stopniowe zwyrodnienie motoneuronów ogranicza liczbę pozostających, czynnych jednostek ruchowych.
3. Wyższy proporcjonalny udział jednostek typu S w grupie zwierząt w końcowym stadium choroby dowodzi, że jednostki tego typu są relatywnie najbardziej odporne na proces chorobowy i przeżywają najdłużej w trakcie rozwoju ALS. Wynik ten może być również efektem transformacji części jednostek szybkich w kierunku wolnych jako odpowiedź na ich znacząco zwiększoną aktywność. Niewielki udział jednostek FF w grupie ALS III wiązać należy z stopniowym obumieraniem motoneuronów jednostek tego typu, lub transformacją części z nich do jednostek typu FR.
4. Skrócenie parametrów czasowych skurczu jednostek szybkich, szczególnie FF we wszystkich grupach zwierząt z ALS, przekładające się także na przesunięcia w stronę wyższych częstotliwości krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń, najsilniej zaznaczone dla grupy ALS II, oznacza, że skurcze tężcowe o tym samym poziomie siły wymagają wyższych częstotliwości pobudzeń niż u zwierząt zdrowych.

5. Wzrost nachylenia krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń dla jednostek FF szczurów transgenicyjnych wraz z postępem choroby odzwierciedla ograniczanie zakresu częstotliwości wyładowań motoneuronów odpowiadających skurczom tężcowym niezupełnym.
6. Spadek siły skurczu jednostek FF zwierząt transgenicyjnych może być efektem obumierania w procesie chorobowym najsilniejszych jednostek tego typu, transformacji części słabszych jednostek typu FR do puli jednostek FF w grupie ALS II, spadku średnicy włókien mięśniowych typu FG lub spadku siły generowanej przez pojedyncze włókna mięśniowe. Natomiast wzrost sił skurczu jednostek typu S w grupie ALS III wskazuje na reinerwację przez motoneurony jednostek tego typu szybkich włókien mięśniowych odnerwionych w procesie chorobowym.
7. Spadek odporności na zmęczenie jednostek FR i S może być efektem procesów reinerwacji przez motoneurony jednostek typu S odnerwionych włókien mięśniowych jednostek szybkich, charakteryzujących się niższą odpornością na zmęczenie i/lub transformacji jednostek szybkich w kierunku wolnych.
8. Wydłużenie latencji potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych w stosunku do bodźca w przebiegu ALS, które było najwcześniej obserwowaną zmianą cech jednostek motorycznych, zaznaczoną już grupie ALS I, wskazuje na zmiany w komórce nerwowej lub wczesne stadium zwyrodnienia aksonalnego, skutkujące spadkiem prędkości przewodzenia aksonów motoneuronów i/lub przewodnictwa w płycie motorycznej.

9. Wzrost amplitudy potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych typu S w terminalnym etapie choroby wskazuje na zaawansowane procesy reinerwacji przez jednostki tego typu odnerwionych włókien mięśniowych.
10. Spadek średniej wartości sił skurczów jednostek FF we wszystkich grupach szczurów z ALS oraz stosunku siły skurczu pojedynczego do tężcowego jednostek FF w grupach ALS II i ALS III sugerują, że największe motoneurony giną w największym stopniu, nawet w obrębie jednostek ruchowych typu FF.
11. Uzyskane wyniki wskazują, że za procesy reinerwacji odnerwionych włókien mięśniowych szybkich w przebiegu ALS odpowiadają głównie motoneurony jednostek wolnych, ale w efekcie tego procesu częściowo upodabniają się do jednostek szybkich. O takim kierunku plastyczności świadczą mniejsze nachylenie krzywych zależności siły od częstotliwości pobudzeń, wyższe wartości sił skurczu pojedynczego i tężcowego, wyższy stosunek siły skurczu pojedynczego do tężcowego, większa zdolność do potężcowego wzmocnienia siły skurczu, obserwowane dla jednostek typu S w grupie ALS III, pogarszająca się w kolejnych grupach zwierząt transgenicznych odporność na zmęczenie oraz wzrost amplitudy potencjałów czynnościowych w grupie ALS III w stosunku do kontroli.
12. Rozwój ALS u transgenicznych szczurów ma charakter dynamiczny. Początkowo obejmuje zmiany cech jednostek szybkich i wiąże się głównie z przeciążeniem mięśni, a w ostatecznym etapie jednostki szybkie giną w dużym stopniu, a głębokim zmianom podlegają cechy jednostek wolnych

7. Piśmiennictwo

1. Adamek D, Tomik B. Stwardnienie boczne zanikowe. ZOZ Ośrodek UMEA Shinoda-Kuracejo (2005).
2. Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* (2001), 49:176-185.
3. Alves CJ, de Santana LP, Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* (2011), 1394:90-104.
4. Andersen PM. (2006a). Amyotrophic lateral sclerosis genetics with Mendelian inheritance. W: Brown RH, Swash M, Pasinelli P (red), *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. London: Informa Healthcare, s.:187-207.
5. Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2006b), 6:37-46.
6. Armon C, Kurland LT, Daube JR, O'Brien PC. Epidemiologic correlates of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (1991), 41:1077-1084.
7. Armon C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J Neurol Sci* (2007), 262:45-53.
8. Ashley Z, Sutherland H, Lanmüller H, Russold MF, Unger E, Bijak M, Mayr W, Boncompagni S, Protasi F, Salmons S, Jarvis JC. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007), 292:440-451.
9. Bakels R, Kernell D. Matching between motoneurone and muscle unit properties in rat medial gastrocnemius. *J Physiol* (1993), 463:307-24.
10. Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* (2001), 90:345-57.
11. Barbeito AG, Martinez-Palma L, Vargas MR, Pehar M, Mañay N, Beckman JS, Barbeito L, Cassina P. Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis* (2010), 37:574-80.
12. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* (2010), 48:629-41.
13. Benatar M. (2006). *Neuromuscular disease. Evidence and analysis in clinical neurology*. Totowa, New Jersey: Humana Press, s.:43-60.
14. Bodine SC, Roy RR, Eldred E, Edgerton R. Maximal force as a function of anatomical features of motor units in the cat tibialis anterior. *J Neurophysiol* (1987), 57:1730-45.

15. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* (2006), 52:39-59.
16. Borg J, Edström L, Butler-Browne GS, Thornell LE. Muscle fibre type composition, motoneuron firing properties, axonal conduction velocity and refractory period for foot extensor motor units in dystrophia myotonica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1987), 50:1036-44.
17. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* (2000), 1:293-9.
18. Brown MC, Ironton R. Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles. *J Physiol* (1978), 278:325-48.
19. Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* (1973) 234:723-48.
20. Burke RE, Rudomin P, Zajac FE. Catch property in single mammalian motor units. *Science* (1970), 168:122-4.
21. Burke RE. (1981). Motor units: anatomy, physiology, and functional organization. W: Brooks (red), *Handbook of Physiology, The Nervous System, Motor Control*. II. Bethesda, MD, USA: American Physiological Society, część 1, tom1, s.:345–422.
22. Celichowski J, Grottel K, Bichler E. Relationship between the tension-time area and the frequency of stimulation in motor units of the rat medial gastrocnemius muscle. *J Physiol Pharmacol* (2000), 51:291-302.
23. Celichowski J, Grottel K. Changes in tension-frequency relationship of motor units induced by their activity in rat muscle. *Arch Ital Biol* (1997) 135:229-37
24. Celichowski J, Grottel K. The dependence of the twitch course of medial gastrocnemius muscle of the rat and its motor units on stretching of the muscle. *Arch Ital Biol* (1992), 130:315-25.
25. Celichowski J, Grottel K. The influence of a doublet of stimuli at the beginning of the tetanus on its time course. *Acta Neurobiol Exp* (1998), 58:47-53.
26. Celichowski J, Grottel K. Twitch/tetanus ratio and its relation to other properties of motor units. *Neuroreport* (1993), 5:201-4.
27. Celichowski J, Kryściak K, Krutki P, Majczyński H, Górská T, Sławińska U. Time-related changes of motor unit properties in the rat medial gastrocnemius muscle after the spinal cord injury. II. Effects of a spinal cord hemisection. *J Electromyogr Kinesiol* (2010), 20:532-41.
28. Celichowski J, Mrówczyński W, Krutki P, Górská T, Majczyński H, Sławińska U. Changes in motor units contractile properties of the rat medial gastrocnemius muscle after spinal cord transection. *Exp Physiol* (2006), 91:887-95.

29. Celichowski J, Pogrzebna M, Raikowa RT. Analysis of the unfused tetanus course in fast motor units of the rat medial gastrocnemius muscle. *Arch Ital Biol* (2005), 143:51-63.
30. Celichowski J, Raikova R, Drzymała-Celichowska H, Ciechanowicz-Kowalczyk I, Krutki P, Rusev R. Model-generated decomposition of unfused tetani of motor units evoked by random stimulation. *J Biomech* (2008) 41:3448-54.
31. Celichowski J. (2006). Budowa i czynność tkanki mięśniowej. W: Górski J (red), Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s.:102-44.
32. Celichowski J. Motor units of medial gastrocnemius muscle in the rat during the fatigue test. II. Changes in the time course of sequential tetani of fatigue test. *Acta Neurobiol Exp* (1992), 52:99-111.
33. Chamberlain S, Lewis DM. Contractile characteristics and innervations ratio of rat soleus motor units. *J Physiol* (1989), 412:1-21.
34. Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Epidemiol* (2007), 166:810-6.
35. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* (2003), 302:113-7.
36. Cook SA, Johnson KR, Bronson RT, Davisson MT. Neuromuscular degeneration (nmd): a mutation on mouse chromosome 19 that causes motor neuron degeneration. *Mamm Genome* (1995), 6:187-91.
37. Cork LC, Price DL, Griffin JW, Sack GH Jr. Hereditary canine spinal muscular atrophy: canine motor neuron disease. *Can J Vet Res* (1990), 54:77-82.
38. Cozzolino M, Ferri A, Carri MT. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* (2008), 10:405-43.
39. Cummings JF, de Lahunta A, George C, Fuhrer L, Valentine BA, Cooper BJ, Summers BA, Huxtable CR, Mohammed HO. Equine motor neuron disease; a preliminary report. *Cornell Vet* (1990), 80:357-79.
40. Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. The "Dying-Back" Phenomenon of Motor Neurons in ALS. *J Mol Neurosci* (2011), 43:470-7.
41. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* (2001), 65:1–105.
42. de Carvalho M, Pinto S, Swash M. Motor unit changes in thoracic paraspinal muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* (2009), 39:83-6.
43. de Carvalho M, Swash M. (2006). Conventional neurophysiology in amyotrophic lateral sclerosis. W: Brown RH, Swash M, Pasinelli P (red), Amyotrophic Lateral Sclerosis. London: Informa Healthcare, s.:105-23.

44. Dengler R, Konstanzer A, Kuther G, Hesse S, Wolf W, Struppeler A. Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle Nerve* (1990), 13:545-50.
45. Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde BO, Robberecht W, Hespel P. Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis* (2003), 13:264-72.
46. Dhaliwal GK, Grewal RP. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport* (2000), 11:2507-9.
47. Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP, Meininger V. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (2008), 70:1004-9.
48. Dupuis L, Loeffler JP. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* (2009), 9:341-6.
49. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* (2011), 10:75-82.
50. Elliott JL. Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* (1999), 6:310-20.
51. Emeryk-Szajewska B, Kostera-Pruszczyk A, Rowińska-Marcińska K, Karwańska A. Median nerve electrophysiological assessment in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* (1998), 32:39-49.
52. Fang F, Bellocco R, Hernan MA, Ye W. Smoking, snuff dipping and the risk of amyotrophic lateral sclerosis-a prospective cohort study. *Neuroepidemiology* (2006), 27:217-21.
53. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Jr., Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* (1997), 69:2064-74.
54. Fisher TJ, Vrbova G, Wijetunge A. Partial denervation of the rat soleus muscle at two different developmental stages. *Neurosci* (1989), 28:755-63.
55. Flück M, Schmutz S, Wittwer M, Hoppeler H, Desplanches D. Transcriptional reprogramming during reloading of atrophied rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005), 289:4-14.
56. Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* (2000), 20:2534-42.
57. Funalot B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* (2009), 10:113-7.
58. Gardiner P, Michel R, Olha A and Pettigrew F. Force and fatiguability of sprouting motor units in partially denervated rat plantaris. *Exp Brain Res* (1987), 66:595-606.

59. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* (2000), 20:660-5.
60. Gordon T, Hegedus J, Tam SL. Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res* (2004), 26:174-85.
61. Gordon T, Tyreman N, Li S, Putman CT, Hegedus J. Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* (2010), 37:412-22.
62. Gordon T, Tyreman N, Rafuse VF, Munson JB. Fast- to-slow conversion following chronic low-frequency activation of medial gastrocnemius muscle in cats. I. Muscle and motor unit properties. *J Neurophysiol* (1997), 77:2585–604.
63. Goslow GE, Cameron WE, Stuart DG. The fast twitch motor units of cat ankle flexor. 1. Tripartite classification on basis of fatigability. *Brain Res* (1977), 134:35-46.
64. Grieb P. Stwardnienie zanikowe boczne: uwarunkowania genetyczne i transgeniczny model choroby. Szkoła wiosenna 2005: genetyczne podstawy chorób neurodegeneracyjnych.
65. Grieb P. Transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *Folia Neuropathol* (2004), 42:239-48.
66. Grottel K, Celichowski J, Anissimowa N. Wpływ częstotliwości drażnienia jednostek ruchowych mięśnia brzuchatego przyśrodkowego szczura na ich siłę skurczu. *Roczniki Naukowe AWF w Poznaniu* (1993), 42:73-80.
67. Grottel K, Celichowski J. (2000). Organizacja mięśnia i sterowanie ruchem. Część I. Organizacja mięśnia. Poznań: Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.
68. Grottel K, Celichowski J. Division of motor units in medial gastrocnemius muscle of the rat in the light of variability of their principal properties. *Acta Neurobiol Exp* (1990), 50:571-87.
69. Grottel K, Celichowski J. The influence of changes in the stimulation pattern on force and fusion in motor units of the rat medial gastrocnemius muscle. *Exp Brain Res* (1999), 127:298-306.
70. Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* (1998), 23:249-56.
71. Hausmanowa-Petrusewicz I. (1999). Rola elektromiografii w diagnostyce chorób mięśni. W: Hausmanowa-Petrusewicz I (red), *Choroby nerwowo-mięśniowe*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, s.:26-62.
72. Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* (2007), 28:154-64.

73. Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* (2008), 586:3337-51.
74. Herbiak MA, Chrapusta SJ, Kowalczyk A, Grieb P. Maintenance of the rat transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis expressing human SOD1^{G93A} mutation. *Folia Neuropathol* (2006), 44:149-53.
75. Herbiak MA. (2008). Transgeniczny szczurzy model rodzinnej postaci stwardnienia zanikowego bocznego i jego zastosowanie do przedklinicznej oceny potencjalnych leków. (Rozprawa doktorska). Zakład Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa.
76. Hirano A, Llena JF. (1983). W: Rosenberg RN (red). *The Clinical Neurosciences. Neuropathology*. New York, Edinburgh, London, Melbourne: Churchill Livingstone, s.:308-11.
77. Hirano M, Angelini C, Montagna P, Hays AP, Tanji K, Mitsumoto H, Gordon PH, Naini AB, DiMauro S, Rowland LP. Amyotrophic lateral sclerosis with ragged-red fibers. *Arch Neurol* (2008), 65:403-6.
78. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99:1604-9.
79. Huey KA, Bodine SC. Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur J Biochem* (1998), 256:45-50.
80. Inghilleri M, Iacovelli E. Clinical neurophysiology in ALS. *Arch Ital Biol* (2011), 149:57-63.
81. Ishihara A, Roy RR, Ohira Y, Edgerton VR. Motoneuron and sensory neuron plasticity to varying neuromuscular activity levels. *Exerc Sport Sci Rev* (2003), 31:51-7.
82. Ishihara A, Roy RR, Ohira Y, Iyata Y, Edgerton VR. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. *J Appl Physiol* (1998), 84:2183-9.
83. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* (2008) 40:572-4.
84. Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* (2005), 2:195-201.
85. Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM, Sandler DP. Association of cigarette smoking with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* (1999), 18:194-202.

86. Kamel F, Umbach DM, Stallone L, Richards M, Hu H, Sandler DP. Association of lead exposure with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Environ Health Perspect* (2008), 116:943-7.
87. Kanda K, Hashizume K. Factors causing difference in force output among motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *J Physiol* (1992), 448:677-95.
88. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* (1992), 140:691-707.
89. Keizman D, Ish-Shalom M, Berliner S, Maimon N, Vered Y, Artamonov I, Tseheri J, Nefussy B, Drory VE. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress? *J Neurol Sci* (2009), 285:95-9.
90. Kernell D, Ducati A, Sjöholm H. Properties of motor units in the first deep lumbrical muscle of the cat's foot. *Brain Res* (1975), 98:37-55.
91. Kernell D, Eerbeek O, Verhey BA. Relation between isometric force and stimulus rate in cat's hindlimb motor units of different twitch contraction time. *Exp Brain Res* (1983), 50:220-7.
92. Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol* (2005), 169:561-7.
93. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* (2011), 377:942-55.
94. Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* (1998), 18:3241-50.
95. Kong J, Xu Z. Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* (2000), 281:72-4.
96. Kozłowski S, Nazar K, Chwalbińska-Moneta J. (1995). Trening fizyczny – mechanizmy i efekty fizjologiczne. W: Kozłowski S, Nazar K (red), *Wprowadzenie do fizjologii klinicznej*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s.:290-324.
97. Krarup C. Enhancement and diminution of mechanical tension evoked by staircase and by tetanus in rat muscle. *J Physiol* (1981), 311:355-72.
98. Krarup C. Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* (2011), 122:414-22.
99. Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Muller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* (2005), 128:1870-6.
100. Krutki P, Celichowski J, Kryściak K, Sławińska U, Majczyński H, Rędownicz MJ. Division of motor units into fast and slow on the basis of profile of 20 Hz unfused tetanus. *J Physiol Pharmacol* (2008a), 59:353-63.

101. Krutki P, Celichowski J, Lochyński D, Pogrzebna M, Mrówczyński W. Interspecies differences of motor units properties in the medial gastrocnemius muscle of cat and rat. *Arch Ital Biol* (2006), 144:11-23.
102. Krutki P, Ciechanowicz I, Celichowski J, Cywińska-Wasilewska G. Comparative analysis of motor unit action potentials of the medial gastrocnemius muscle in cats and rats. *J Electromyogr Kinesiol* (2008b), 18:732–40.
103. Krutki P, Pogrzebna M, Drzymała H, Raikova R, Celichowski J. Force generated by fast motor units of the rat medial gastrocnemius muscle during stimulation with pulses at variable intervals. *J Physiol Pharmacol* (2008c), 59:85-100.
104. Kuffler SW, Hunt CC, Quilliam JP. Function of medullated small-nerve fibers in mammalian ventral roots; efferent muscle spindle innervation. *J Neurophysiol* (1951), 14:29-54.
105. Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bär PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese AB. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* (2004), 91:571-5.
106. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (2009), 323:1205-8.
107. Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* (2009), 136:1001-4.
108. Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim Biophys Acta* (2006), 1762:1109-21.
109. Larsson L. Motor units: remodeling in aged animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (1995), 50:91-5.
110. Leterme D, Falempin M. Contractile properties of rat soleus motor units following 14 days of hindlimb unloading. *Pflugers Arch* (1996), 432:313-9.
111. Lieber RL, Johansson CB, Vahlsing HL, Hargens AR, Feringa ER. Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle. I. Contractile properties. *Exp Neurol* (1986), 91:423-34.
112. Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* (2002), 22:4825-32.
113. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, Swingler RJ, Beghi E. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2008), 79:6-11.

114. Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y, van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurol* (1998), 55:201–6.
115. Luff AR. Age-associated changes in the innervation of muscle fibers and changes in the mechanical properties of motor units. *Ann NY Acad Sci* (1998), 854:92-101.
116. Łochyński D, Krutki P, Celichowski J. Effect of ageing on the regulation of motor unit force in rat medial gastrocnemius muscle. *Exp Gerontol* (2008), 43:218-28.
117. Łochyński D. (2006). Wpływ starzenia się organizmu na regulację siły skurczu jednostek ruchowych w modelu zwierzęcym (Rozprawa doktorska). Zakład Neurobiologii Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego, Poznań.
118. Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N, Tarnopolsky MA. Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* (2004), 29:656-62.
119. Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R, Navarro X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* (2011), 122:1660-70.
120. Martins KJB, Gordon T, Pette D, Dixon WT, Foxcroft GR, MacLean IM, Putman CT. Effect of satellite cell ablation on low-frequency-stimulated fast-to-slow fibre-type transitions in rat skeletal muscle. *J Physiol* (2006), 1:281-94.
121. McComas AJ. Invited review: motor unit estimation: methods, results, and present status. *Muscle Nerve* (1991), 14:585-97.
122. Meier MP, Klein MP, Krebs D, Grob D, Müntener M. Fiber transformations in multifidus muscle of young patients with idiopathic scoliosis. *Spine* (1997), 22:2357-64.
123. Messer A, Flaherty L. Autosomal dominance in a late-onset motor neuron disease in the mouse. *J Neurogenet* (1986), 3:345-55.
124. Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* (2007), 369:2031-41.
125. Mitchell JD, Davies RB, Al-Hamad A, Gattrell AC, Batterby G. MND risk factors: an epidemiological study in the north west of England. *J Neurol Sci* (1995), 129:61–4.
126. Morozova N, Weisskopf MG, McCullough ML, Munger KL, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Diet and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology* (2008), 19:324-37.
127. Mrówczyński W, Celichowski J, Krutki P, Cabaj A, Sławinska U, Majczyński H. Changes of the force-frequency relationship in the rat medial gastrocnemius muscle after total transection and hemisection of the spinal cord. *J Neurophysiol* (2011), 105:2943-50.
128. Mrówczyński W, Celichowski J, Krutki P, Górska T, Majczyński H, Sławińska U. Time-related changes of motor unit properties in the rat medial gastrocnemius muscle after spinal cord injury. I. Effects of total spinal cord transection. *J Electromyogr Kinesiol* (2010), 20:523-31.

129. Mrówczyński W, Celichowski J, Krutki P. Interspecies differences in the force-frequency relationship of the medial gastrocnemius motor units. *J Physiol Pharmacol* (2006), 57:491-501.
130. Mrówczyński W, Krutki P, Celichowski J. Double stimulation modulates afterhyperpolarization phase following action potentials evoked in rat motoneurons. *Acta Neurobiol Exp* (2007), 67:439-46.
131. Munson JB, Foehring RC, Mendell LM, Gordon T. Fast-to-slow conversion following chronic low-frequency activation of medial gastrocnemius muscle in cats. II. Motoneuron properties. *J Neurophysiol* (1997), 77:2605-15.
132. Murray B, Mitsumoto H. (2006). The spectrum of motor neuron disorders. W: Brown RH, Swash M, Pasinelli P (red), *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. London: Informa Healthcare, s.:3-24.
133. Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* (2001), 21:9246-54.
134. Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT, McGuire V. Population-Based Case-Control Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Western Washington State. II. Diet. *Am J Epidemiol* (2000a), 151:164-73.
135. Nelson LM, McGuire V, Longstreth WT, Jr., Matkin C. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in Western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *Am J Epidemiol* (2000b), 151:156-63.
136. Nelson LM, McGuire V. (2006). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. W: Brown RH, Swash M, Pasinelli P (red), *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. London: Informa Healthcare, s.:25-41.
137. Niebrój-Dobosz I, Dziewulska D, Kwieciński H. Oxidative damage to proteins in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Folia Neuropathol* (2004), 42(3):151-6.
138. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med* (2008), 38:579-606.
139. Noble EG, Pettigrew FP. Appearance of "transitional" motor units in overloaded rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1989), 67:2049-54.
140. Ohira Y, Yoshinaga T, Nonaka I, Ohara M, Yoshioka T, Yamashita-Goto K, Izumi R, Yasukawa K, Sekiguchi C, Shenkman BS, Kozzlovskaya IB. Histochemical responses of human soleus muscle fibers to long-term bedrest with or without countermeasures. *Jpn J Physiol* (2000), 50:41-7.
141. Olha AE, Jasmin BJ, Michel RN, Gardiner PF. Physiological responses of rat plantaris motor units to overload induced by surgical removal of its synergists. *J Neurophysiol* (1988), 60:2138-51.

142. Oliveira AS, Pereira RD. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): three letters that change the people's life. For ever. *Arq Neuropsiquiatr* (2009), 67:750-82.
143. Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis* (2010), 37:493-502.
144. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* (2006), 7:710-23.
145. Peter IB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of tree fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* (1972), 11:2627-33.
146. Pette D. Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle. *J Heart Lung Transplant* (1992), 11:299-305.
147. Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C. Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* (2003), 351:153-6.
148. Pilaczyńska-Szcześniak Ł, Celichowski J. (2006). Wpływ wysiłku fizycznego na mięśnie szkieletowe. W: Górski J (red), *Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s.:145-56.
149. Plato CC, Garruto RM, Galasko D, Craig UK, Plato M, Gamst A, Torres JM, Wiederholt W. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. *Am J Epidemiol* (2003), 157:149-57.
150. Pogrzebna M, Celichowski J. Changes in the contractile properties of motor units in the rat medial gastrocnemius muscle after one month of treadmill training. *Acta Physiol* (2008), 193:367-79.
151. Pogrzebna M. (2007). Wpływ treningu wytrzymałościowego na cechy skurczu jednostek ruchowych mięśnia szkieletowego ssaków (Rozprawa doktorska). Zakład Neurobiologii Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego, Poznań.
152. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* (2008), 88:1243-76.
153. Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* (2001), 21:3369-74.
154. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* (2006), 9:408-19.
155. Qureshi M., Brown Jr RH, Rogers JT, Cudkowicz ME. Serum ferritin and metal levels as risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Open Neurol J* (2008), 2:51-4.

156. Rafałowska J. (1999). Stwardnienie zanikowe boczne. W: Hausmanowa-Petrusewicz I (red), Choroby nerwowo-mięśniowe. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, s.:439-54.
157. Rafuse VF, Gordon T, Orozco R. Proportional enlargement of motor units after partial denervation of cat triceps surae muscles. *J Neurophysiol* (1992), 68:1261-76.
158. Rafuse VF, Gordon T. Incomplete rematching of nerve and muscle properties in motor units after extensive nerve injuries in cat hindlimb muscle. *J Physiol* (1998), 15:909-26.
159. Rafuse VF, Gordon T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. I. Comparisons of the capacity of regenerating nerves to form enlarged motor units after extensive peripheral nerve injuries. *J Neurophysiol* (1996), 75:268-81.
160. Rao MV, Nixon RA. Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurochem Res* (2003), 28:1041-7.
161. Reinking RM, Stephens JA, Stuart DG. The motor units of cat medial gastrocnemius: problem of their categorization on the basis of mechanical properties. *Exp Brain Res* (1975), 23:301-13.
162. Röckl KS, Hirshman MF, Brandauer J, Fujii N, Witters LA, Goodyear LJ. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* (2007), 56:2062-9.
163. Roos PM, Vesterberg O, Nordberg M. Metals in Motor Neuron Diseases. *Exp Biol Med* (2006), 231:1481-7.
164. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* (1993), 362:59-62.
165. Salińska E, Danysz W, Łazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* (2005), 43:322-39.
166. Scarmeas N, Shih T, Stern Y, Ottman R, Rowland LP. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* (2002), 59:773-5.
167. Schluter JM, Fitts RH. Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. *Am J Physiol* (1994), 266:1699-73.
168. Sharma KR, Kent-Braun JA, Majumdar S, Huang Y, Mynhier M, Weiner MW, Miller RG. Physiology of fatigue in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (1995), 45:733-40.
169. Sharma KR, Miller RG. Electrical and mechanical properties of skeletal muscle underlying increased fatigue in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* (1996), 19:1391-400.
170. Shaw CA, Höglinger GU. Neurodegenerative Diseases: Neurotoxins as Sufficient Etiologic Agents? *Neuromolecular Med* (2008), 10:1-9.

171. Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Annals of Neurology* (1995), 38:691-5.
172. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2005), 76:1046-57.
173. Sherrington CS. *The integration of the nervous system*. Yale Univ. Press, New Haven (1906) (Reprinted 1947).
174. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* (2010), 1802:45-51.
175. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (2008), 319:1668-72.
176. Stålberg EV, Andreassen S, Falck B, Lang H, Rosenfalck A, Trojaborg W. Quantitative analysis of individual motor unit potentials: a proposition for standardized terminology and criteria for measurement. *J Clin Neurophysiol* (1986), 3:313-48.
177. Stein JM, Padykula HA. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am J Anat* (1962), 110:103-23.
178. Suzuki M, Watanabe T, Mikami H, Nomura M, Yamazaki T, Irie T, Ishikawa H, Yasui K, Ono S. Immunohistochemical studies of vascular endothelial growth factor in skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* (2009), 285:125-9.
179. Talbot K. Motor neurone disease. *Postgrad Med J* (2002), 78:513-9.
180. Tam SL, Archibald V, Tyreman N, Jassar B, Gordon T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J Neurosci* (2001), 21:654-67.
181. Tam SL, Gordon T. Neuromuscular activity impairs the function of terminal Schwann cells in muscle reinnervation by sprouting. *J Neurobiol* (2003), 57:221-34.
182. Thompson LV. Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Phys Ther* (1994), 74:71-81.
183. Tovar-Y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Tapia R. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener* (2009), 4:31.
184. Troost D, van den Oord JJ, de Jong JM, Swaab DF. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* (1989), 8:289-94.
185. Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1990), 16:401-10.
186. Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* (2009), 8:94-109.

187. Van Den Bosch L, Robberecht W. (2006). Transgenic mouse and mutagenesis models. W: Brown RH, Swash M, Pasinelli P (red), Amyotrophic Lateral Sclerosis. London: Informa Healthcare, s.:241-55.
188. Van Den Bosch L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol* (2011), doi:10.1155/2011/348765.
189. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* (2009), 323:1208-11.
190. Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Titulaer MJ, Wokke JH, van den Berg LH. Physical activity and the association with sporadic ALS. *Neurology* (2005), 64:241–5.
191. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* (2005), 35:1045-62.
192. von Lewinski F, Keller BU. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* (2005), 28:494-500.
193. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* (2004), 287:1342-8.
194. Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkowicz M, Ascherio A. Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol* (2004), 160:26-33.
195. Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* (1998), 156:65-72.
196. Wijsekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* (2009), 4:3.
197. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* (1999), 2:50-6.
198. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* (2001), 191:3-9.
199. Xie Y, Weydt P, Howland DS, Kliot M, Moller T. Inflammatory mediators and growth factors in the spinal cord of G93A SOD1 rats. *Neuroreport* (2004), 15:2513-6.
200. Xu GP, Dave KR, Moraes CT, Busto R, Sick TJ, Bradley WG, Pérez-Pinzón MA. Dysfunctional mitochondrial respiration in the wobbler mouse brain. *Neurosci Lett* (2001), 300:141-4.
201. Yang JF, Stein RB, Jhamandas J, Gordon T. Motor unit numbers and contractile properties after spinal cord injury. *Ann Neurol* (1990), 28:496-502.