

Die motorische Innervation von Muskelfasertypen in der Skelettmuskulatur von Schweinen

LÁSZLÓ SZENTKUTI und ROBERT G. CASSENS

Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bundesrepublik Deutschland und Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin - Madison, Wisconsin, U.S.A.

Die motorische Innervation von Muskelfasertypen im *M. longissimus dorsi* und *M. semitendinosus* von Schweinen ist mit histochemischen und mit elektrophysiologischen Methoden untersucht worden. Die Ergebnisse zeigen, daß die intramuskuläre Verästelung von motorischen Nervenaxonen im Verlauf der Nerven im Perimysium stattfindet. Während der Embryonalentwicklung der Skelettmuskulatur von Schweinen werden die zuerst gebildeten "Gerüstmuskelfasern" früher innerviert als die "Sekundärfasern", doch kann dieser zeitliche Unterschied nicht der alleinige Grund für die Differenzierung der Muskelfasertypen sein. Im *M. semitendinosus* von Ferkeln sind die zu einer motorischen Einheit gehörenden Muskelfasern in miteinander benachbarten Muskelfaserbündeln in der Weise verteilt, daß innerhalb eines jeden Muskelfaserbündels nur eine einzige Muskelfaser vom selben Motoneuron innerviert ist. In den Muskelfaserbündeln sind die Muskelfasern von langsamkontrahierenden motorischen Einheiten jeweils zentral und die Muskelfasern von schnellkontrahierenden motorischen Einheiten jeweils peripher lokalisiert.

Motor innervation of fiber types in skeletal muscle of pigs

LÁSZLÓ SZENTKUTI and ROBERT G. CASSENS

Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Germany, and Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin - Madison, U.S.A.

Motor innervation of muscle fiber types was studied by histochemical and electrophysiological methods in *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus* of pigs. The results show that intramuscular branching of motor nerve axons occurs in perimysium. During fetal development of skeletal muscle of pigs first developed frame muscle fibers are innervated earlier than "secondary fibers", but this time difference cannot be the only reason for differentiation of muscle fiber types. In *M. semitendinosus* of young pigs, muscle fibers of a single motor unit are distributed in adjacent fascicles in the manner that a single muscle fiber in each fascicle is innervated by the same motoneuron only. Muscle fibers of slowly contracting motor units are each located in fascicular boundaries centrally, while muscle fibers of fast contracting motor units are each located peripherally.

## A 12:2

L'innervation motrice des types de fibres musculaires dans la musculature du squelette du porc

LÁSZLÓ SZENTKUTI et ROBERT G. CASSENS

Institut de Physiologie de l'Ecole Vétérinaire de Hanovre, République Fédérale Allemande et Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin - Madison, Wisconsin, USA.

L'innervation motrice des types de fibres musculaires du M. longissimus dorsi et M. semitendinosus des porcs a été analysé avec des méthodes histochimiques et électrophysiologiques. Les résultats montrent que la ramification intramusculaire des axones moteurs a lieu pendant le cours des nerfs dans le pérимыsium. Pendant le développement embryonal de la musculature du squelette des porcs "les fibres musculaires de base", formées d'abord, sont innervées plutôt que le sont les "fibres musculaires secondaires", cependant cette différence temporaire ne peut pas être la seule raison pour une différenciation des types de fibres musculaires. Dans le M. semitendinosus de cochonnets les fibres musculaires appartenant à une unité motrice sont réparties, dans les paquets de fibres musculaires voisins, de tel façon qu'à l'intérieur de chaque paquet de fibres musculaires seulement une seule fibre musculaire est innervée du même motoneuron. Dans les paquets de fibres musculaires, d'une part les fibres musculaires d'unités motrices, se contractant lentement, se localisent au centre, d'autre part les fibres musculaires, se contractant rapidement, se trouvent en périphérie.

### Моторная иннервация типов мышечных волокон в скелетной мускулатуре свиней

LÁSZLÓ SZENTKUTI и ROBERT G. CASSENS

Физиологический институт ветеринарного высшего учебного заведения Ганновер, Федеративная Республика Германии и Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin - Madison, Висконсин, США.

Моторная иннервация типов мышечных волокон в M. longissimus dorsi и M. semitendinosus свиней исследована гистохимическими и электрофизиологическими методами. Результаты показывают, что внутримышечное разветвление моторных нервных аксонов происходит в ходе нервов в соединительнотканной оболочке мышцы (Perimysium). Во время эмбрионального развития скелетной мускулатуры свиней сперва образованные "каркасные мышечные волокна" иннервируются раньше чем "вторичные волокна", однако это временное различие не может быть единственной причиной для дифференцирования типов мышечных волокон. В M. semitendinosus поросят к одной моторной единице принадлежащие мышечные волокна в соседних с друг с другом пучках мышечных волокон распределены таким образом, что внутри каждого пучка мышечных волокон иннервируется лишь одно единственное мышечное волокно того же самого моторного нейрона. В пучках мышечных волокон мышечные волокна медленносокращающихся моторных единиц локализованы в каждом случае центрально, а мышечные волокна быстросокращающихся моторных единиц в каждом случае периферически.

## Die motorische Innervation von Muskelfasertypen in der Skelettmuskulatur von Schweinen

LASZLO SZENTKUTI und ROBERT G. CASSENS

Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bundesrepublik Deutschland  
und Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin-Madison, U.S.A.

### Einleitung

In der Skelettmuskulatur von Schweinen sind die Fasertypen I, IIA und IIB (rote, intermediäre und weiße Muskelfasern) nach einem für diese Tierart charakteristischen System angeordnet. Im Zentrum der Muskelfaserbündel befindet sich jeweils eine Gruppe von roten Muskelfasern, die von einigen benachbarten intermediären Fasern und am äußeren Rand der Muskelfaserbündel in der Regel von weißen Muskelfasern umgeben ist (Szentkuti und Cassens, 1978). Sowohl die Differenzierung als auch die Prägung der Muskelfasertypen ist entscheidend von der motorischen Innervation abhängig. Die Denervation eines Muskels führt beim Schwein zur Auflösung des charakteristischen Fasertypenmusters und zur Atrophie der Muskelfasern (Beermann und Mitarbeiter 1977). Wichtige Fragen der Muskelfaser-motorischen Nervaxon-Beziehung in der Skelettmuskulatur von Schweinen sind in den letzten Jahren bereits geklärt worden (Swatland und Cassens 1971, 1973 und 1974; Beermann und Cassens 1977; Beermann, Cassens, Hausmann 1978). Die Verteilung von Muskelfasern einzelner motorischer Einheiten in der Skelettmuskulatur von Schweinen war jedoch bisher nicht bekannt. Weiterhin waren einige Fragen über die Entwicklung von Muskelfasertypen sowie deren motorische Innervation bisher ungeklärt.

### Material und Methodik

Die Entwicklung der motorischen Innervation von Muskelfasertypen im M. longissimus dorsi und M. semitendinosus von Schweinen ist mit histochemischen Färbemethoden untersucht worden, beginnend mit dem embryonalen Alter von 45 Tagen nach Befruchtung.

Ferner wurden im M. semitendinosus von 6 bis 10 Wochen alten Ferkeln mittels einer kombinierten elektrophysiologischen und histochemischen Technik die zur selben motorischen Einheit gehörenden Muskelfasern dargestellt.

Zur Darstellung von intramuskulären Nerven und von motorischen Endplatten wurden Längs- und Querschnitte von Muskelproben nach dem von Beermann und Cassens (1976) und von Toop (1976) beschriebenen Verfahren behandelt. Zur Unterscheidung von Muskelfasertypen dient die Aktivität der  $Ca^{++}$ -abhängigen Myosin-ATPase nach der von Guth und Samaha (1970) sowie von Tunell und Hart (1977) beschriebenen Technik. Für die gleichzeitige Darstellung von Muskelfasertypen und von motorischen Endplatten im selben histologischen Schnitt war bisher keine Färbetechnik bekannt. Für diesen Zweck wurde ein kombiniertes Färbeverfahren, basierend auf einer Färbung der Schnitte für die sauer vorbehandelte Myosin-ATPase mit anschließender Acetylcholinesterasefärbung und Silberimprägnierung, entwickelt.

Zur Identifizierung und zur Charakterisierung einzelner motorischer Einheiten im M. semitendinosus von 6 - 10 Wochen alten Ferkeln (n = 16) ist die von Taylor und Stephens (1976) beschriebene Methode herangezogen worden. Zunächst wurde im freipräparierten Muskel von vollnarkotisierten Tieren nach Reizung über Mikroelektroden und unter Kontrolle der Aktionspotentiale am Oszillographen eine motorische Einheit identifiziert und anschließend für 5 Minuten mit 2 Impulsen/sec., danach für 10 Minuten mit 10 Impulsen/sec und zuletzt für einige Minuten mit 100 Impulsen/sec. gereizt, um in den Muskelfasern die Glykogenreserven zu entleeren. Der gesamte Muskel ist dann für die histologische Untersuchung entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren worden. Zur Identifizierung der vom Glykogen entleerten Muskelfasern wurden Querschnitte (15µ) aus dem Muskel nach der Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Reaktion gefärbt.

### Ergebnisse

#### a) Allgemeine Befunde

In Längsschnitten aus dem M. longissimus dorsi und M. semitendinosus waren vom 60. Tag nach Befruchtung an Innervierungsbande sichtbar, die quer zur Muskelfaserichtung verliefen. Die terminale Ästenbildung der motorischen Nervenaxone fand im Perimysium statt.

#### b) Die Entwicklung der motorischen Innervation von Muskelfasertypen

Die zuerst gebildeten, primären "Gerüstmuskelfasern" des embryonalen Skelettmuskels von Schweinen waren 45 Tage nach Befruchtung innerviert (Abb. 1A). Jede primär gebildete Muskelfaser war in älteren Embryonen (50 und mehr Tage nach Befruchtung) von kleineren "Sekundärfasern" umgeben (Abb. 1B). Die sekundären Muskelfasern wurden erst nach dem 45. Tag der Embryonalentwicklung gebildet und wiesen unmittelbar nach ihrer lichtmikroskopischen Erkennbarkeit acetylcholinesteraseaktive Stellen am Sarkolemm auf (Abb. 1B und 1C). Die Sekundärfasern waren während des Embryonalstadiums in der Regel kleiner als die Primärfasern. Zwischen dem 45. Tag und etwa dem 95. Tag nach Befruchtung waren die acetylcholinesteraseaktiven Bereiche um die relativ großen Primärfasern herum größer als um die kleineren Sekundärfasern (Abb. 1C). Zwischen dem 65. Tag und dem 90. Tag nach Befruchtung waren im M. longissimus dorsi und dem tiefgelegenen Anteil des M. semitendinosus von Schweineembryonen blumenknochenartige "Innervierungsringe" sichtbar, deren jeweiliges Zentrum aus einer einzigen dunkelgefärbten Typ I-Muskelfaser bestand (Abb. 1D, 1E und 1F), die als Primärfaser identifiziert werden konnten (Abb. 1B und 1D). In den Muskelfaserbündeln haben sich als Erste die frühzeitig innervierten embryonalen Fasern zu Muskelfasern des histochemischen Typ I (rot) entwickelt. Zwischen dem 95. Tag nach Befruchtung und dem 10. Tag nach der Geburt der Ferkel entwickelten sich einige zur Primärfaser benachbarten, sekundär gebildeten Muskelfasern ebenfalls zu Typ I-Fasern, eingeordnet aufgrund ihrer Myosin-ATPase-Aktivität (Abb. 1G und 1H). Im caudalen-superficialen

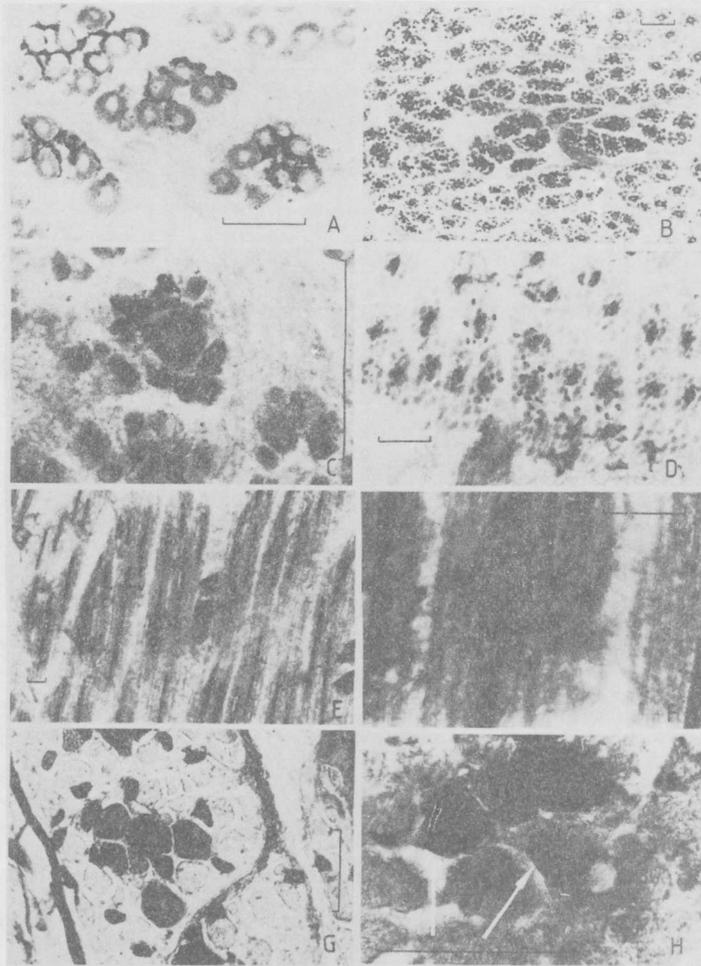


Abbildung 1: Die Entwicklung der motorischen Innervation von Muskelfasertypen in der Hinterbeinmuskulatur (A), im M. semitendinosus (B,C,D,E,F,H) und im M. longissimus dorsi (G) von Schweinen am 45. Tag (A), 76. Tag (B,C), 85. Tag (D) und am 92. Tag nach Befruchtung (E,F) sowie im Alter von 7 (H) bzw. 10 Tagen (G). Darstellung nach einer eigenen Kombinationsmethode. Muskelfasern des Typs I und motorische Endplatten sind dunkel gefärbt. Die Linie repräsentiert jeweils 50  $\mu$ .

Figure 1: Development of motor innervation in skeletal muscle of posterior limb (A), M. semitendinosus (B,C,D,E,F,H) and M. longissimus dorsi (G) of pigs at 45 days (A), 76 days (B,C), 85 days (D) and 92 days of gestation (E,F) and at postnatal age of 7 (H) or 10 days (G). Visualization by own combination procedure. Type I fibers and motor end-plates are stained dark. The line represents in each picture 50  $\mu$ .

Bereich des M. semitendinosus war die Faserdifferenzierung abweichend von der in der Abb. 1 dargestellten Form.

#### c) Motorische Einheiten im M. semitendinosus von Ferkeln

Nach Durchführung der von Taylor und Stephens (1976) beschriebenen Technik am freipräparierten M. semitendinosus von narkotisierten, 6-10 Wochen alten Ferkeln wurden Kontraktionszeiten zwischen 50 msec und 325 msec registriert.

Langsame motorische Einheiten kontrahierten sich in 200 bis 325 msec (Abb. 2, unten). Eine Ermüdung trat bei diesen S-(slow)-Einheiten weder nach Reizung mit 2 Impulsen/sec. für 5 Minuten, noch nach einer anschließenden Reizung mit 10 Impulsen/sec. für 10 Minuten ein (Abb. 3, unten). Die gereizten, vom Glykogen entleerten Muskelfasern waren nach der PAS-Reaktion nur in einem tiefgelegenen Teilbereich des M. semitendinosus zu finden, wo diese Fasern in miteinander benachbarten Muskelfaserbündeln verteilt waren. Pro Muskelfaserbündel war in der Regel nur eine einzige Muskelfaser vom Glykogen entleert. Nach Reizung einer solchen S-Einheit waren die glykogenfreien Muskelfasern jeweils im Zentrum der Muskelfaserbündel lokalisiert (Abb. 4A), wo die Muskelfasern aufgrund der Myosin-ATPase-Reaktion als Typ I-(rote)-Muskelfasern identifiziert werden konnten.

Nach Reizung einer schnellkontrahierenden F-(fast)-Einheit (Kontraktionszeit zwischen 50 und 100 msec, Abb. 2, oben) wurde bereits nach Reizung mit 2 Impulsen/sec für 5 Minuten eine deutliche Ermüdung der Muskelfasern registriert (Abb. 3, oben). Nach PAS-Färbung von histologischen Schnitten waren glykogenfreie Muskelfasern in einem Teilbereich des Muskelquerschnittes in miteinander benachbarten Muskelfaserbündeln zu sehen. Pro Muskelfaserbündel war in der Regel jeweils nur eine einzige Muskelfaser von Glykogen befreit (Abb. 4B). Nach Reizung einer F-Einheit waren die glykogenfreien Muskelfasern jeweils an der Peripherie der Mus-

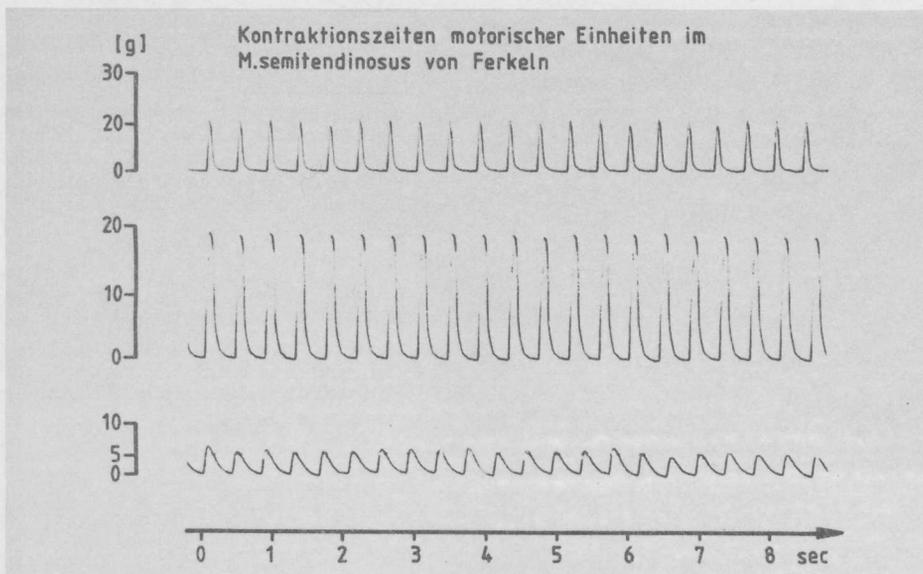


Abbildung 2: Kontraktionszeiten schnell- (oben), weniger schnell (mittlere Kurve) und langsamkontrahierender (unten) motorischer Einheiten im M. semitendinosus von Ferkeln. Ungleiche Y-Achsen (Amplitude = Hubkraft), da die Versuchsanordnung bei jedem Versuch neu geeicht werden mußte.

Figure 2: Contraction times of fast (upper graphic), less fast (middle) and slowly contracting (bottom) motor units in M. semitendinosus of piglets. Unequal Y-axes (amplitude = lifting power) following now calibration of the equipment in each experiment.

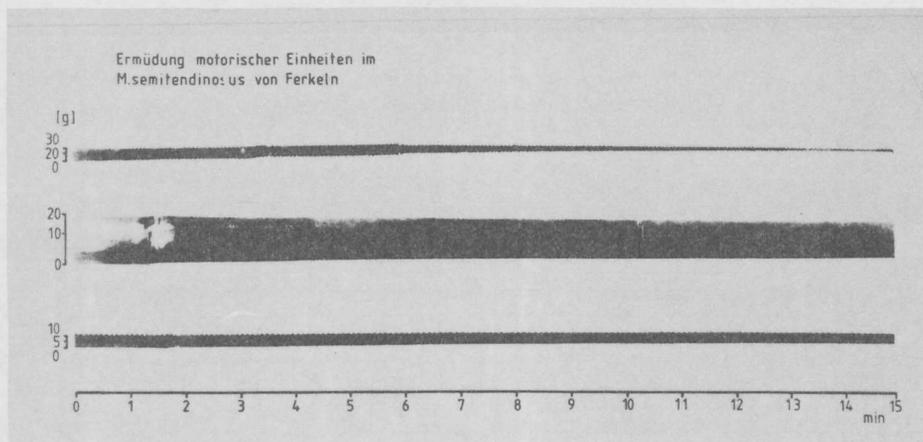


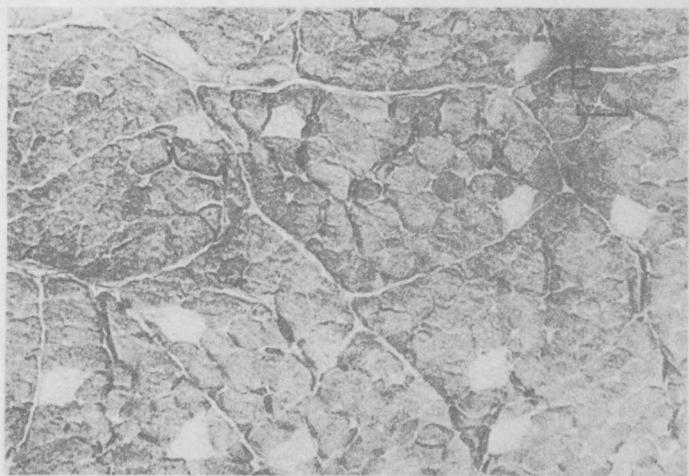
Abbildung 3: Ermüdungsverlauf schnell- (oben), nur zu Anfang der Stimulation- (mittlere Kurve) und kaum ermüdender (unten) motorischer Einheiten im M. semitendinosus von Ferkeln nach Reizung mit überschwelligen Impulsen für 15 Minuten. Zu beachten sind die Unterschiede der Y-Achsen.

Figure 3: Fatiguability of fast- (upper graphic), only at start of stimulation- (middle) and scarcely fatigable (bottom) motor units in M. semitendinosus of piglets. Notice differences between Y-axes.



Abbildung 4: Querschnitte aus dem M. semitendinosus von 8 Wochen alten Ferkeln nach Reizung einer langsamkontrahierend-ermüdungsresistenten-(A) sowie einer schnellkontrahierend-schnellermüdenden (B) motorischen Einheit. PAS-Färbung. Die Linie stellt 50  $\mu$  dar.

Figure 4: Cross sections of M. semitendinosus of 8 weeks old piglets after stimulation of a slow-contracting-not fatigable (A) and of a fast contracting-fast fatigable (B) motor unit. PAS-staining. The line represents 50  $\mu$ .



kelfaserbündel lokalisiert (Abb. 4B), wo sie aufgrund der Myosin-ATPase-Reaktion als Muskelfasern des Typs IIB (weiß) identifiziert wurden. Die motorischen Einheiten mit Kontraktionszeiten zwischen 100 und 200 msec wiesen in ihrem Verhalten eine weite Variationsbreite auf und waren meist relativ ermüdungsresistent.

Schrifttum:

- BEERMANN, D.H. and R.G. CASSENS, *Stain Technol.* 51, 173-177 (1976). - BEERMANN, D.H. and R. G. CASSENS, *Anat. Embryol.* 150, 123-127 (1977). - BEERMANN, D.H., R.G. CASSENS, C.C. COUCH and F.J. NAGLE, *J. Neurol. Sci.* 31, 207-221 (1977). - BEERMANN, D.H., R.G. CASSENS, J. Anim. Sci. 46, 125-132 (1978). GUTH, L. and F.J. SAMAHA, *Exp. Neurol.* 28, 365-367 (1970). - SWATLAND, H.J. and R.G. CASSENS, *J. Anim. Sci.* 33, 750-758 (1971). - SWATLAND, H.J. and R.G. CASSENS, *J. Anim. Sci.* 36, 343-354 (1973). - SWATLAND, H.J. and R.G. CASSENS, *J. Anim. Sci.* 38, 1092-1101 (1974). - SZENTKUTI, L. and R.G. CASSENS, *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 85, 23-27 (1978). - TAYLOR, A. and J.A. STEPHENS, *Brain Res.* 117, 331-335 (1976). - TOOP, J., *Stain Technol.* 51, 1-6 (1976). - TUNELL, G.L. and M.N. HART, *Arch. Neurol.* 34, 171-173 (1977).