

**Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego  
w Poznaniu**

---

mgr Joanna Rakoczy (Grzesiak)

***Rozprawa doktorska***

*Przejściowe obniżenie generowanej siły skurczu jednostek ruchowych po  
spadku częstotliwości pobudzeń*

***Autoreferat***



Promotor:

prof. dr hab. Jan Celichowski

---

**Poznań 2021**

Joanna Rakoczy (Grzesiak) MS

*Doctoral dissertation*

*The transitory force decrease following a sudden reduction in frequency  
of stimulation of motor units*



Supervisor:

Prof. Jan Celichowski

---

Poznań 2021

## **Spis Treści**

I. Autoreferat w języku polskim .....	str. 4
II. Streszczenie .....	str. 29
III. Abstract .....	str. 32
IV. Załączniki .....	str. 35

- Oświadczenia współautorów

- Grzesiak i wsp., 2019 (Artykuł nr 1)

- Rakoczy i wsp., 2020 (Artykuł nr 2)

## I. Autoreferat w języku polskim

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Przejściowe obniżenie generowanej siły skurczu jednostek ruchowych po spadku częstotliwości pobudzeń”, w którego skład wchodzi dwa artykuły przygotowane na podstawie badań wykonanych w ramach projektu naukowego nr 2015/19/N/NZ7/01617, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

1. Grzesiak J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. **Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius**, Journal of Electromyography and Kinesiology 46, 14–20, 2019; March 2, 2019; doi: 10.1016/j.jelekin.2019.02.008; impact factor – 1,740; punktacja ministerstwa – 100 pkt.
2. Rakoczy J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Raikova R., Celichowski J. **Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate**, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation 12(1):60, 2020; September 29, 2020; doi: 10.1186/s13102-020-00208-6; impact factor – 1,979; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

## Wstęp

Siła skurczu mięśni szkieletowych może być regulowana za pomocą dwóch podstawowych mechanizmów kontrolowanych przez ośrodkowy układ nerwowy, w których kluczową rolę odgrywają motoneurony. Tymi mechanizmami są: rekrutacja (dekrutacja) jednostek ruchowych do skurczu (Henneman, 1957; Henneman i wsp., 1965) oraz zmiana częstotliwości wyładowań motoneuronów czynnych jednostek ruchowych (De Luca i Erim, 1994; De Luca i wsp., 1982; Person i Kudina, 1972; Kernell i wsp., 1983). Jednostki ruchowe są najmniejszymi czynnościowymi strukturami układu nerwowo-mięśniowego, które złożone są z motoneuronu i zespołu włókien mięśniowych unerwianych na zasadzie wyłączności przez taki neuron, rozproszonych w obrębie jednego mięśnia. Niniejsza rozprawa dotyczy badań w zakresie drugiego z wymienionych mechanizmów - wpływu układu wyładowań motoneuronów na rozwój siły skurczu włókien mięśniowych unerwianych przez ten neuron.

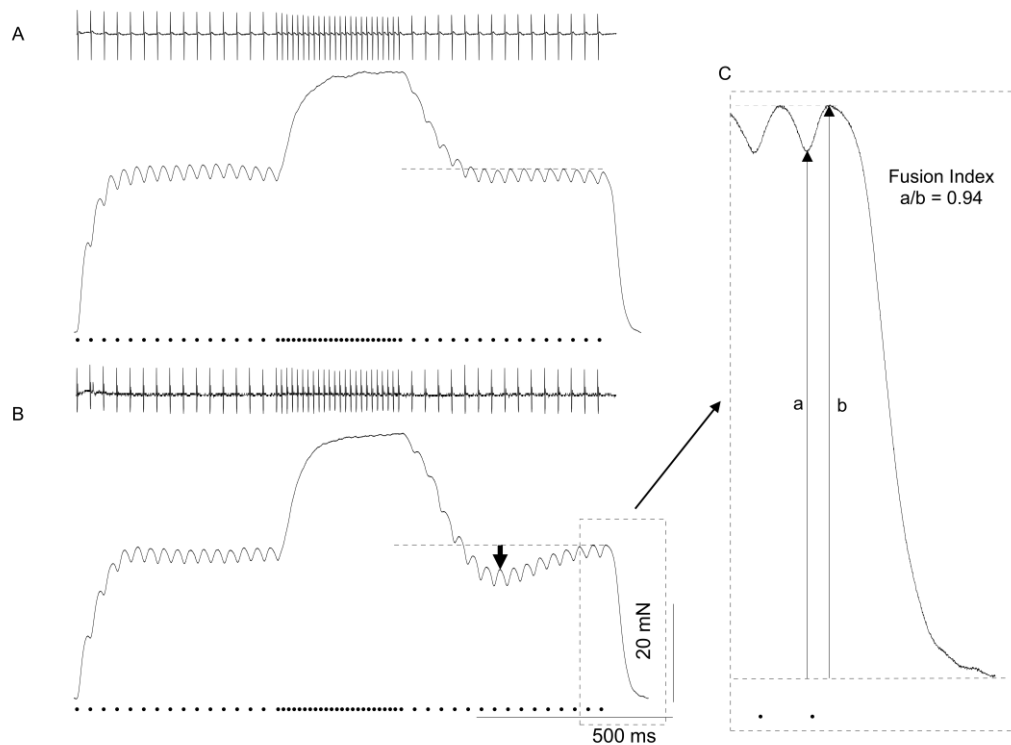
W wielu klasycznych eksperymentach dotyczących wpływu wzorców wyładowań motoneuronów na regulację siły stosowano stymulacje mięśni lub wyizolowanych jednostek ruchowych ciągami bodźców o stałej, skokowo zmieniającej się częstotliwości, a wyniki przedstawiano w postaci wykresu zależności siły skurczu od częstotliwości pobudzeń (Kernell i wsp., 1983). Jednakże, co najlepiej ilustrują badania elektromiograficzne prowadzone na ludziach, podczas aktywności motoneurony jednostek ruchowych generują potencjały w zmiennych odstępach czasu (Adam i wsp., 1998; Boe i wsp., 2005; Masuda i De Luca 1991; Moritz i wsp., 2005; Westergaard i De Luca 2001). Fakt ten świadczy o tym, że aktualna wiedza o skutkach zmian w układzie pobudzeń i ich wpływu na przebieg siły skurczu stale pozostaje niepełna.

Największa liczba obserwacji badawczych, dotyczących skutków zmian w układzie pobudzeń dotyczy efektów zmian odstępów w obrębie początkowych wyładowań

motoneuronów. Wiadomo, że motoneurony rozpoczynając swoją aktywność mogą generować na początku ciągu wyładowań dwa potencjały o krótkim odstępie czasu (dublet) (Person i Kudina, 1972; Bawa i Calancie, 1983; Garland i Griffin, 1999), który powoduje skokowy wzrost siły skurczu – „*catch effect*” (Burke i wsp., 1976; Celichowski i Grottel, 1998). W innych doświadczeniach testowano efekty zmian długości odstępów pomiędzy kolejnymi pobudzeniami w trakcie trwania skurczów tężcowych i analizowano modulację przebiegu siły badanych jednostek ruchowych. Zaobserwowano, że wydłużenie oraz skrócenie odstępu pomiędzy dwoma kolejnymi bodźcami powoduje dla wszystkich jednostek ruchowych odpowiednio: spadek oraz wzrost siły, a efekty te były w znaczącym stopniu zależne od stopnia wypełnienia skurczu tężcowego (Grottel i Celichowski, 1999). Na tej podstawie oceniono, że skurcz tężcowy najbardziej podatny na zmiany w układzie pobudzeń cechuje się stopniem wypełnienia około 0,5. Wreszcie, gdy testowany był wpływ skokowego (Celichowski, 2001) lub płynnego (Celichowski i wsp., 2004) wzrostu częstotliwości pobudzeń na rozwój siły, zaobserwowano nieznane wcześniej zjawisko redukcji siły skurczu w relacji do odpowiedzi, w której skurcz nie był poprzedzany stymulacją o niskiej częstotliwości („*tetanic depression*”). To zjawisko było obecne nawet wówczas, gdy wydłużeniu ulegał tylko jeden odstęp czasowy pomiędzy dwoma pierwszymi stosowanymi pobudzeniami (Celichowski i wsp., 2011).

W ramach badań pilotażowych, które miały na celu poszerzenie wiedzy na temat skutków zmian częstotliwości pobudzeń, podczas trwania skurczu tężcowego niezupełnego, zaobserwowano zaskakujący i nieznany wcześniej efekt. Uwidaczniał się on podczas skokowych zmian częstotliwości stymulacji z wyższej na niższą i polegał na pojawieniu się przejściowego spadku siły skurczu poniżej poziomu oczekiwanego dla tej niższej częstotliwości (ryc. 1, Grzesiak i wsp., 2019). Po tym spadku siła skurczu powracała (po okresie ok. 200-300 ms) do poziomu takiego, jak był oczekiwany dla stosowanej niższej

częstotliwości pobudzeń. Badania prowadzone na potrzeby pracy doktorskiej miały na celu wyjaśnienie tego zjawiska, wpływającego na przebiegu siły skurczu aktywnych jednostek motorycznych.



Ryc. 1. Amplituda przejściowego spadku siły przy zastosowaniu stymulacji trójfazowej niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości o parametrach 30-75-30 Hz. Rozmieszczenie zastosowanych bodźców zaznaczono kropkami pod wykresami siły. Ciągi potencjałów czynnościowych jednostek motorycznych zaznaczono powyżej wykresów siły. Przejściowy spadek siły (zaznaczony pogrubioną strzałką) po nagłym zmniejszeniu częstotliwości stymulacji przedstawiony został tylko w części B. Pozioma przerywana linia stanowi odniesienie do wartości siły osiąganey na końcu stymulacji bodźcami niskiej częstotliwości, a strzałka wskazuje amplitudę badanego spadku siły. Powiększona część zapisu w części C przedstawia sposób obliczenia wskaźnika wypełnienia ( $a/b$ ) (Grzesiak i wsp., 2019).

## Cel badań

Celem pierwszej części badań było określenie wielkości i charakteru zmian przebiegu siły aktywnych jednostek motorycznych podczas zastosowania układu pobudzeń o skokowo zmiennej częstotliwości: niskiej-wysokiej-niskiej. Na podstawie uzyskanych wyników

analizowano zarówno amplitudę przejściowego spadku siły w trzeciej fazie stymulacji jak i częstotliwość występowania tego zjawiska w zależności od typu jednostek ruchowych (Grzesiak i wsp., 2019, publikacja 1). Celem dalszej części badań była: ocena wpływu rozciągnięcia mięśnia na badane zjawisko, oszacowanie minimalnej liczby bodźców o wysokiej częstotliwości niezbędnej do wywołania tego efektu, testowanie wrażliwości badanego efektu podczas koaktywacji jednej lub kilku jednostek ruchowych oraz określenie czy przejściowy spadek siły występuje również podczas płynnego (nie skokowego) spadku częstotliwości pobudzeń. Dodatkowo, w celu głębszego zrozumienia mechanizmu badanego spadku siły, dokonano analizy parametrów pojedynczych odpowiedzi badanych jednostek ruchowych na kolejne pobudzenia zdekomponowane ze skurczu tężcowego (Rakoczy i wsp., 2020, publikacja 2).

*Hipotezy badawcze:*

1) Badany przejściowy spadek siły skurczu wynikający ze spadku częstotliwości pobudzeń jest zjawiskiem, które jest zależne od typu jednostek ruchowych i ich cech skurczu (publikacja 1).

2) Badany spadek siły ma podłoże biomechaniczne:

a. zależy od stopnia rozciągnięcia mięśnia poddanego stymulacji (publikacja 2),

b. przy zastosowaniu niewielkiej liczby bodźców o wysokiej częstotliwości w środkowej części skurczu tężcowego badane zjawisko nie występuje (publikacja 2),

c. badany efekt spadku siły skurczu jest zależny od liczby aktywnych równocześnie jednostek ruchowych (publikacja 2).

3) Przejściowy spadek siły skurczu jest obecny także podczas płynnego spadku częstotliwości stymulacji z wyższej do niższej (publikacja 2).



## Metody

### *Procedury laboratoryjne*

Doświadczenia zostały wykonane w warunkach *in vivo* na mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki szczurów Wistar w narkozie pentobarbitalowej. Badano jednostki ruchowe trzech typów: FF (ang. *fast fatigable*) – jednostki szybkie, nieodporne na zmęczenie, FR (ang. *fast resistant to fatigue*) – jednostki szybkie, odporne na zmęczenie, S (ang. *slow*) – jednostki wolne. W celu funkcjonalnej izolacji pojedynczych jednostek ruchowych, korzenie grzbietowe L4-L6 były dzielone na coraz cieńsze wiązki aksonów, aż do uzyskania odpowiedzi „wszystko albo nic” podczas okołoprogowej stymulacji tych wiązek prostokątnymi impulsami elektrycznymi o zmiennej amplitudzie. Po osiągnięciu czynnościowej izolacji jednostki ruchowe były kolejno poddawane następującemu protokołowi stymulacji:

1. 5 impulsów o częstotliwości 1 Hz (rejestracja skurczu pojedynczego),
2. 500 ms stymulacji bodźcami o częstotliwości 40 Hz (rejestracja skurczu tężcowego niepełnego),
3. 300 ms stymulacji bodźcami o częstotliwości 150 Hz (rejestracja skurczu tężcowego pełnego).

Rejestracje uzyskane podczas tej części procedur (pkt. 1-3) służyły określeniu podstawowych cech skurczu jednostek ruchowych, tj. czasu skurczu, czasu połowicznego rozkurczu, siły skurczu pojedynczego, siły skurczu tężcowego pełnego oraz określeniu typu badanych jednostek ruchowych.

4. trójfazowe ciągi bodźców o niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości dostosowane do typu jednostek ruchowych (główna część rejestracji, w której badano występowanie efektu przejściowego spadku siły):

- dla jednostek szybkich obu typów (F) stosowano ciągi bodźców o niskiej częstotliwości w zakresie 10-50 Hz (pierwsza i trzecia faza), o czasie trwania 500 ms, oraz bodźce o wysokiej częstotliwości w zakresie 75-150 Hz (faza środkowa), o czasie trwania 300 ms,

- dla jednostek wolnych (S) stosowano ciągi bodźców o niskiej częstotliwości (pierwsza i trzecia faza) w zakresie 10-25 Hz, o czasie trwania 1000 ms, oraz bodźce o wysokiej częstotliwości w zakresie 30-50 Hz (środkowa faza), o czasie trwania 300 ms (publikacja 1 i część doświadczeń w ramach publikacji 2).

Każda stymulacja była oddzielona dziesięciosekundową przerwą. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone przy optymalnym rozciągnięciu mięśnia – 100 mN (publikacja 1).

Do analiz w ramach obu publikacji włączano jednostki ruchowe wykazujące badane zjawisko (przejściowy spadek siły o amplitudzie powyżej 3%) przy zmianie stymulacji z wysokiej na niską. W ramach doświadczeń, których wyniki stały się podstawą drugiej publikacji badano: 1. zależność spadku siły od stopnia rozciągnięcia mięśnia; 2. minimalną liczbę bodźców o wysokiej częstotliwości niezbędną do wywołania badanego spadku siły jednostki ruchowej; 3. wpływ równoległego skurczu tężcowego innych jednostek ruchowych na badane zjawisko przejściowego spadku siły skurczu; 4. obecność badanego zjawiska w przypadku skokowego i płynnego spadku częstotliwości pobudzeń (w celu obserwacji efektów płynnego spadku częstotliwości pobudzeń stosowano stymulację ze zmieniającą się sinusoidalnie częstotliwością bodźców); 5. zmienność parametrów odpowiedzi na kolejne

pobudzenia (mające kształt pojedynczych skurczów), uzyskanych matematyczną metodą dekompozycji skurczu tężcowego z wyraźnym, przejściowym spadkiem siły skurczu.

### **Publikacja 1**

Badania zostały wykonane na 11 samicach szczurów. Wyizolowano 161 jednostek ruchowych. Badania objęły analizę cech skurczu jednostek motorycznych, oszacowanie udziału w badanej populacji tych jednostek ruchowych, które prezentują przejściowy spadek siły, analizę amplitudy spadku siły skurczu po zastosowaniu protokołu trójfazowych zmian częstotliwości (niska-wysoka-niska) oraz stopnia wypełnienia, przy którym badane jednostki ruchowe charakteryzowały się największym spadkiem siły.

### **Publikacja 2**

Do tej części badań wykorzystano 10 samic szczurów. Łącznie rejestrowano wywołaną aktywność 122 jednostek motorycznych. Do badań wyselekcjonowano jednostki, które na początku trzeciej fazy stymulacji (niska częstotliwość) prezentowały spadek siły ponad 3% w porównaniu do siły w fazie pierwszej (niska częstotliwość). Ze względu na fakt, że badane zjawisko obserwowano najczęściej dla jednostek typu FR, a dodatkowo jednostki te cechuje stabilność siły skurczu wynikająca z wysokiej odporności na zmęczenie, do badań które wymagały wielu rejestracji, wykorzystano ostatecznie wyłącznie jednostki tego typu. Dla tych wyselekcjonowanych jednostek przeprowadzono alternatywnie następujące procedury badawcze:

1. stymulacje bodźcami o niskiej częstotliwości w zakresie 25-35 Hz i wysokiej częstotliwości w zakresie 75-90 Hz w układzie niska-wysoka-niska częstotliwość - obserwowano zjawisko spadku siły w mięśni o różnym stopniu napięcia z pasywną siłą wynoszącą 30, 100, 200 mN) (6 jednostek ruchowych rejestrowanych w wybranych

kombinacjach powyższych częstotliwości, dla których w co najmniej jednej wybranej długości mięśnia odnotowywany był spadek siły – 35 kombinacji);

2. stymulacje z wykorzystaniem minimalnej liczby bodźców o wysokiej częstotliwości, które przyczyniały się do wywołania badanego zjawiska spadku siły przy zastosowaniu 75 i 90 Hz wysokiej częstotliwości (testowano efekt skrócenia 1, 2, 4, 6, 18 odstępów między bodźcami w środkowej części stymulacji) (8 jednostek ruchowych w 2 kombinacjach wysokiej częstotliwości 75 i 90 Hz – 16 kombinacji);

3. stymulacje z wykorzystaniem równoległych aktywacji innych jednostek motorycznych zlokalizowanych w tym samym mięśniu i analizę wpływu ich skurczu na przebieg badanego zjawiska (efekt testowano wywołując równoległy skurcz tężcowy pojedynczych jednostek ruchowych lub grup jednostek). W tej części badań wykorzystano 2 kanały stymulatora: poprzez jeden kanał w czasie 2000 ms z częstotliwością 150 Hz stymulowana była cienka wiązka aksonów zawierająca tylko jeden akson biegnący do badanego mięśnia, pobudzająca więc wyłącznie jedną jednostkę ruchową lub grubsza wiązka aksonów, zawierająca kilka aksonów biegnących do badanego mięśnia, co wywoływało skurcz kilku jednostek ruchowych. Na drugim kanale z opóźnieniem 250 ms od początku stymulacji przez kanał pierwszy była prowadzona stymulacja trójfazowa o niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości wybranej jednostki ruchowej wykazującej obecność badanego zjawiska. Rejestracje takie zostały przeprowadzone na 13 jednostkach ruchowych w 53 kombinacjach, tj. pojedyncze jednostki ruchowe lub ich grupy były kilkakrotnie stymulowane przez pierwszy kanał równoległe z pobudzaniem jednej z trzynastu jednostek ruchowych, u których występowało zjawisko przejściowego spadku siły, pobudzanych przez drugi kanał;

4. stymulacje z wykorzystaniem płynnej, zmiennej sinusoidalnie częstotliwości pobudzeń dla określenia czy badane zjawisko spadku siły uwidaczniające się dla jednostek ruchowych

podczas skokowej zmiany częstotliwości w układzie niskiej-wysokiej-niskiej jest obecne także w trakcie płynnego spadku tej częstotliwości. Do analizy tej zastosowano sinusoidalne tempo zmian częstotliwości w zakresie 2-4 cykli na sekundę, a zakres zmian częstotliwości stymulacji był dostosowany indywidualnie do każdej z badanych jednostek motorycznych tak, by generowały one skurcze tężcowe niezupełne. Badania te przeprowadzono na 9 jednostkach motorycznych wykazujących silne spadki sił skurczu w trzeciej fazie stymulacji (o niskiej częstotliwości) w celu porównania wielkości zjawiska podczas skokowych i sinusoidalnych zmian częstotliwości dla każdej z badanych jednostek ruchowych;

5. dekompozycja skurczów 10 jednostek ruchowych, u których badane zjawisko było obecne, z zastosowaniem matematycznej metody dekompozycji skurczu tężcowego niezupełnego na odpowiedzi na poszczególne pobudzenia (Celichowski i wsp., 2008).

## **Wyniki i ich omówienie**

### **Publikacja 1**

Głównym rezultatem badań, przedstawionym w tej publikacji, było opisanie nieznanego wcześniej zjawiska związanego z procesem regulacji siły skurczu jednostek ruchowych w zależności od układu pobudzeń generowanych przez motoneuron czyli przejściowego spadku siły skurczu do poziomu poniżej oczekiwanej wartości bezpośrednio po skokowym zmniejszeniu częstotliwości pobudzeń. Spadek siły badany w eksperymentach przy zastosowaniu trójfazowych stymulacji w układzie niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości był zjawiskiem, jakie zaobserwowano dla jednostek motorycznych wszystkich trzech typów (FF, FR, S) (ryc. 2, Grzesiak i wsp., 2019). Jednakże zjawisko to nie występowało dla wszystkich badanych jednostek ruchowych (jego obecność stwierdzono w 78 ze 161 badanych jednostek - 48,5%), a częstotliwość jego występowania wyraźnie różniła się między jednostkami różnych typów. Najczęściej badany spadek siły występował w

jednostkach typu FR – w 54 z 82 przypadków, z mniejszą częstotliwością w przypadku jednostek typu S - 11 z 31 przypadków oraz jednostek typu FF - 13 z 48 przypadków (odpowiednio, stanowiło to 65,9%, 35,5% i 27,1%) (ryc. 3A, Grzesiak i wsp., 2019). Ten spadek siły wśród jednostek typu FR wynosił średnio 13,0% (najwyższa odnotowana wartość spadku siły dla jednostek typu FR wynosiła 36,5%), wśród jednostek typu S wynosił 8,9% (maksymalna wartość spadku siły – 19,0%), a wśród jednostek typu FF średnia odnotowana wartość spadku siły wynosiła 6,2% (maksymalna wartość spadku siły wynosiła 13,8%) (ryc. 3B, Grzesiak i wsp., 2019). Jednostki ruchowe, dla których wystąpił spadek siły, charakteryzowały się dłuższym czasem skurczu ( $p < 0,05$  dla jednostek typu FR). Także wartości siły skurczu pojedynczego i tężcowego zupełnego były niższe dla jednostek typu FR i FF, u których odnotowano badany przejściowy spadek siły, w stosunku do badanych jednostek tego samego typu, u których takiego spadku nie odnotowano ( $p < 0,05$ ) (tab.1, Grzesiak i wsp., 2019). Analizowano także zależność pomiędzy poziomem wypełnienia skurczu tężcowego, w którym oceniano wartość spadku siły, a amplitudą spadku siły skurczu w obrębie każdego z trzech typów jednostek, jednak nie stwierdzono występowania istotnych korelacji. Niemniej należy podkreślić, że największy spadek siły był odnotowywany dla skurczów tężcowych o stopniu wypełnienia w zakresie 0,5-0,9 (ryc. 4, Grzesiak i wsp., 2019). W przypadku jednostek ruchowych typu FF i FR badany efekt był najsilniej zaznaczony dla częstotliwości stymulacji w zakresie 20-40 Hz, z największym odnotowywanym spadkiem siły zwykle dla częstotliwości 30 Hz. Dla jednostek motorycznych typu S największy przejściowy spadek siły odnotowywano w przypadku częstotliwości 15-25 Hz (ryc. 5, Grzesiak i wsp., 2019). Analiza wyników dowiodła również, że wartość siły w środkowej fazie stymulacji (która była zmienna i wynosiła 75, 90 lub 150 Hz) nie wpływała na amplitudę badanego spadku siły, natomiast zmiana niskiej częstotliwości stymulacji (w pierwszej i trzeciej fazie rejestrowanego skurczu tężcowego

niezupelnego) warunkowała poziom przejściowego spadku siły dla trzech typów jednostek ruchowych (ryc. 6, Grzesiak i wsp., 2019).

## **Publikacja 2**

Druga publikacja stanowiła rozszerzenie badań eksperymentalnych rozpoczętych w pierwszej pracy badawczej. Treść jej obejmowała procedury doświadczalne, mające na celu wyjaśnienie możliwych przyczyn badanego zjawiska oraz weryfikację hipotez o jego biomechanicznym podłożu. Przyjęto także hipotezę, że badany spadek siły może mieć miejsce podczas płynnych, a nie tylko podczas skokowych zmian częstotliwości stymulacji.

### *1. Wpływ rozciągnięcia mięśnia na amplitudę badanego spadku siły skurczu*

Zjawisko przejściowego spadku siły jednostki ruchowej okazało się być silnie zależne od czynnika jakim jest stopień rozciągnięcia mięśnia. Spośród trzech wartości siły, z jaką rozciągany był mięsień (30, 100, 200 mN), w przypadku 6 badanych jednostek ruchowych, dla których testy przeprowadzano kilkakrotnie przy zastosowaniu różnych kombinacji niskiej i wysokiej częstotliwości stymulacji (łącznie testowano przebieg 35 skurczów tężcowych przy trzech stopniach napięcia mięśnia), największe spadki siły zostały odnotowane przy rozciągnięciu mięśnia do 100 mN (średnio  $15,1 \pm 10,5\%$ ), podczas gdy dla 200 mN średnia wartość spadku siły wynosiła  $11,3 \pm 8,2\%$ , a dla 30 mN -  $5,7 \pm 9,3\%$ . Należy również dodać, że spadek siły został odnotowany u wszystkich 35 badanych jednostek ruchowych przy rozciągnięciu z siłą 100 mN, przy rozciągnięciu mięśnia do 30 mN widoczny był w przypadku 21 z 35 testowanych jednostek, zaś w 6 z 35 sytuacji przy rozciągnięciu do 200 mN badany efekt spadku siły nie wystąpił (ryc. 1, Rakoczy i wsp., 2020).

### *2. Zależność spadku siły od liczby impulsów o wysokiej częstotliwości*

Wysoka częstotliwość stymulacji w środkowej części skurczu tężcowego powoduje wzrost siły skurczu, która zależy od liczby bodźców wysokiej częstotliwości. Liczbę tą

regulowano wprowadzając od 1 do 18 (1, 2, 4, 6, 18) krótkich odstępów (11,1 ms, odpowiada to częstotliwości stymulacji 90 Hz) między bodźcami w środkowej części skurczu tężcowego. Celem tych działań było określenie minimalnej liczby impulsów niezbędnych do wywołania efektu przejściowego spadku siły. Badano w ten sposób 8 jednostek ruchowych, charakteryzujących się największymi spadkami siły w poprzedzających stymulacjach, dla dwóch wartości niskiej częstotliwości stymulacji: 35 lub 40 Hz i środkowej wysokiej częstotliwości 90 Hz. We wszystkich przeprowadzonych próbach, przy ograniczeniu liczby krótkich odstępów między bodźcami do jednego, nie zaobserwowano badanego efektu spadku siły. Jednak wzrost liczby impulsów wysokiej częstotliwości, powodujący stopniowo zwiększający się poziom siły skurczu w środkowej części, wywoływał badany przejściowy spadek siły, jednak zazwyczaj wyraźnie widoczny dopiero, gdy poprzedzała go seria 6 bodźców o zwiększonej częstotliwości (ryc. 2, Rakoczy i wsp., 2020).

### *3. Zależność zjawiska spadku siły od równoległej aktywności innych jednostek ruchowych*

Wpływ równoległych skurczów tężcowych zupełnych na badany spadek siły skurczu był testowany na 13 jednostkach motorycznych pobudzanych w różnych kombinacjach z pojedynczymi jednostkami ruchowymi lub z grupami jednostek (łącznie 53 kombinacji). Zakres zmienności sił skurczów tężcowych równoległe czynnych jednostek wynosił 20,4-987,4 mN. Dla jednostki motorycznej, u której zarejestrowano badane zjawisko spadku siły w określonym układzie niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości, rejestrację powtarzano stosując taki sam wzorzec stymulacji. Jednak w czasie drugiej rejestracji, równoległe do aktywności badanej jednostki ruchowej, w mięśni trwał skurcz tężcowy jednej lub kilku innych, równoległe pobudzanych jednostek. Analizowano różnice w przebiegu badanego zjawiska (spadku siły) pomiędzy dwoma rejestracjami (z równoczesną aktywnością i bez równoczesnej aktywności innej/innych jednostek ruchowych). W większości przypadków amplituda badanego zjawiska ulegała redukcji podczas koaktywacji innych jednostek



ruchowych. Wykazano, że gdy siła współdziałających jednostek ruchowych przekraczała wartość 550 mN, spadek siły w badanej jednostce ruchowej zawsze ulegał zniesieniu, natomiast gdy wartość siły równoległe czynnych jednostek ruchowych była niższa, badane zjawisko spadku siły niekiedy nawet miało większą amplitudę (ryc. 3, Rakoczy i wsp., 2020).

#### *4. Zjawisko przejściowego spadku siły skurczu podczas sinusoidalnych zmian częstotliwości pobudzeń*

Dla 9 jednostek motorycznych, dla których potwierdzono obecność znacznego przejściowego spadku siły po skokowej redukcji częstotliwości stymulacji (w układzie niska-wysoka-niska częstotliwość), rejestrowano siłę skurczu rozwijanego w trakcie stymulacji o częstotliwości zmieniającej się sinusoidalnie. Zaobserwowano, że w trakcie trwania pierwszego cyklu zmian, gdy częstotliwość stymulacji spadała do dolnego poziomu, siła skurczu spadała do niższych wartości niż w przypadku kolejnych powtarzanych cykli stymulacji. Największa odnotowana różnica pomiędzy pierwszym i kolejnymi cyklami w przypadku przejściowych zmian wynosiła 23,9% (ryc. 4, Rakoczy i wsp., 2020).

#### *5. Matematyczny rozkład skurczów tężcowych w przebiegu siły*

W celu głębszego zrozumienia podłoża badanego spadku siły obserwowanego przy stosowanym układzie pobudzeń o niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości, dla 10 jednostek ruchowych, u których amplituda przejściowego spadku siły wahała się od 5,3 do 36,4%, dokonano matematycznej dekompozycji rejestrowanego skurczu na ciąg pojedynczych odpowiedzi na kolejne pobudzenia. Ponieważ dekompozycja może być wykonywana dla skurczów tężcowych niezupełnych, a środkowa część skurczu przy wysokiej częstotliwości stymulacji tego warunku nie spełniała, materiał do dekompozycji uzyskano obliczając różnicę między zapisem siły przy trójfazowym (niska-wysoka-niska) i dwufazowym (niska-wysoka) wzorcu pobudzeń. Zdekomponowane skurcze miały kształt zbliżony do skurczów

pojedynczych, dlatego w modelu tym obliczano następujące ich cechy: czasy skurczu i relaksacji oraz amplitudę siły. Analiza zmienności tych cech skurczu w odpowiedzi na kolejne pobudzenia wykazała, że badany przejściowy spadek siły wynikał ze zmniejszania się amplitud siły i skracania czasu skurczów, natomiast powrót siły skurczu do oczekiwanego poziomu był przede wszystkim efektem wydłużania się czasu skurczów (ryc. 5, Rakoczy i wsp., 2020).

## **Dyskusja**

Omawiany cykl publikacji dotyczył dwóch głównych wątków: po pierwsze, dokonano rejestracji i opisanie nieznanego wcześniej zjawiska przejściowego spadku siły skurczu tęczowego niezupełnego, związanego z redukcją częstotliwości pobudzeń włókien mięśniowych jednostek ruchowych (Grzesiak i wsp., 2019). Po drugie, w ramach dodatkowego cyklu doświadczeń została pozytywnie zweryfikowana hipoteza, że badane zjawisko jest przede wszystkim efektem biomechanicznym i występuje nawet gdy częstotliwość pobudzeń jednostek ruchowych zmniejsza się stopniowo (Rakoczy i wsp., 2020).

Badania, w których ocenia się efekty pobudzania włókien mięśniowych przez różne kombinacje bodźców stymulacyjnych, pozwalają poszerzać wiedzę o roli układu wyładowań motoneuronów w regulacji siły skurczu, ponieważ bodźce stosowane podczas stymulacji w ramach badań skurczu jednostek ruchowych aktywują aksony i są funkcjonalnym odpowiednikiem potencjałów czynnościowych unerwiających je motoneuronów. Zatem opisywane badania przyczyniają się do lepszego rozumienia jednego z dwóch podstawowych mechanizmów regulacji siły skurczu mięśni szkieletowych obok rekrutacji jednostek czyli zmian częstotliwości i układu wyładowań motoneuronów. Obserwacje dokonane w ramach opisywanych eksperymentów wskazują, że proces kodowania siły przez częstotliwość

wyładowań motoneuronów ma charakter nieliniowy, dlatego badania te poszerzają wcześniejsze obserwacje dotyczące przejawów takiej nieliniowości, jak zjawisko „catch effect” (Burke i wsp., 1976; Celichowski i Grottel, 1998), początkowy dublet wyładowań (Person i Kudina, 1972; Bawa i Calancie, 1983; Garland i Griffin, 1999), „tetanic depression” (Celichowski, 2001; Celichowski, 2004) czy histereza krzywej siła-częstotliwość przy porównaniu skutków wzrastającej i malejącej częstotliwości stymulacji (Binder Macleod i wsp., 1989; Frigon i wsp., 2011). Ponadto, podobnie jak we wcześniejszych badaniach regulacji siły skurczu przez zmiany układu pobudzeń dostrzeżono, że amplituda badanego zjawiska zależy od parametrów siły skurczu jednostki ruchowej, jej typu fizjologicznego, układu wyładowań, użytej częstotliwości i stopnia wypełnienia skurczu tężcowego niezupełnego.

Obserwacja, że opisywany przejściowy spadek siły został odnotowany u około połowy badanych jednostek ruchowych świadczy o tym, że zjawisko to ma charakter dość powszechny. Jednak do tej pory zjawisko to pozostawało niedostrzeżone, pomimo tego, że w literaturze można znaleźć doświadczenia, w których stosowano niemal identyczny jak w opisywanych publikacjach układ bodźców tj. trójfazowy ciąg pobudzeń w układzie niska-wysoka-niska częstotliwość stymulacji (Frigon i wsp., 2011; Fuglevand i wsp., 1993). W tych doświadczeniach badano jednak skurcz całego mięśnia – czyli efekt jednoczesnego, synchronicznego pobudzania wielu jednostek ruchowych, a zjawisko przejściowego spadku siły zaobserwowane zostało podczas aktywności pojedynczych jednostek ruchowych (Grzesiak i wsp., 2019). Jak wynika z prezentowanych wyników badane zjawisko zanika w efekcie biomechanicznej interakcji pomiędzy kilkoma współpracującymi jednostkami ruchowymi (Rakoczy i wsp., 2020), zapewne w wyniku zaburzeń transmisji siły generowanej przez włókna mięśniowe do ścięgna mięśniowego przez otaczające je struktury kolagenowe oraz aktywności kilku jednostek ruchowych. Wiadomo, że w przypadku, gdy włókna

mięśniowe kilku aktywnych jednostek ruchowych sąsiadują ze sobą, a ich terytoria nachodzą na siebie, proces transmisji siły odbywa się poprzez wspólne wykorzystywane fragmenty sieci kolagenowej błony podstawnej i uwzględnia wzajemne oddziaływanie jednostek ruchowych na siebie (Meijer, 2007). Z tego powodu, w przypadku wspomnianych badań ze stymulacją całych mięśni przez nerw (Frigon i wsp., 2011; Fuglevand i wsp., 1993), jednocześnie pobudzanych jest wiele jednostek ruchowych (przy supramaksymalnej stymulacji nerwu pobudzone są wszystkie jednostki ruchowe) zajmujących całą objętość mięśnia. Podczas stymulacji nerwu aktywne jednostki generują skurcze o zróżnicowanym stopniu wypełnienia i wówczas w znaczącym stopniu maskowane są dynamiczne zmiany aktywności pojedynczych jednostek ruchowych.

Przejęciowy spadek siły przy nagłych zmianach częstotliwości stymulacji był najczęściej odnotowywany dla jednostek ruchowych typu FR, ale obserwowano go z mniejszą częstością także wśród jednostek typu FF oraz jednostek typu S. Częstotliwość występowania omawianego zjawiska w badanym mięśniu najprawdopodobniej wiąże się z procesami biomechanicznymi, m. in. z przenoszeniem siły w obrębie mięśnia na ścięgno Achillesa. Jednostki ruchowe typu FR rozproszone są przeważnie w tzw. proksymalnym przedziale mięśnia przyśrodkowego brzuchatego łydki (Gardiner i wsp., 1991; De Ruyter i wsp., 1996). Przedział ten zajmuje ok. 40% całkowitej długości mięśnia (część bliższa stawu kolanowego) (Taborowska i wsp., 2016), a obserwowany efekt przejściowego spadku siły po redukcji częstotliwości pobudzeń może być związany z zaburzeniem przekazania siły z jednostek tego przedziału przez przedział dystalny do ścięgna Achillesa. Ten proces przekazywania siły z przedziału proksymalnego do ścięgna Achillesa wiąże się z nagłą zmianą napięcia włókien kolagenowych i mięśniowych w przedziale dystalnym. W odpowiedzi na spadek częstotliwości stymulacji, napięta, bierna część mięśnia zostaje uwolniona (trzecia faza stymulacji) i stopniowo dostosowuje się do mniejszego stopnia

naprężenia, w tempie wolniejszym niż zmiana długości włókien mięśniowych, a w takich warunkach siła skurczu jednostki ruchowej jest okresowo mniej wydajnie przenoszona na ścięgno (zapisy siły wskazują, że ma to miejsce w okresie ok. 200-300 ms, Grzesiak i wsp. 2019, ryc. 2) (Huijing i Jaspers, 2005; Huijing i wsp., 1998).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały również, że badane zjawisko spadku siły skurczu wyraźnie zależy od stopnia biernego napięcia mięśnia i było najsilniejsze, gdy mięsień był pasywnie napięty z siłą 100 mN, czyli w warunkach optymalnych dla rozwinięcia najwyższej siły skurczu jednostek ruchowych różnych typów w mięśniu brzuchatym łydki szczura (Celichowski i Grottel, 1992). Przy nadmiernie wysokim (200 mN) lub zbyt niskim (30 mN) stopniu pasywnego napięcia mięśnia w stosunku do optymalnych wartości, badane zjawisko spadku siły malało lub nawet zanikało. Stopień pasywnego napięcia mięśnia (także niekurczącej się jego części) niewątpliwie zmienia jego sztywność i/lub inne cechy warunkujące transmisję siły skurczu jednostki ruchowej na ścięgno, co może wpływać na przebieg skurczu (w tym przypadku na badane zjawisko).

Siła skurczu jednostek ruchowych jest bardzo zmienna, w badanym mięśniu najsilniejsze jednostki ruchowe mają około 70-krotnie wyższą siłę niż jednostki najslabsze (Grottel i Celichowski, 1990). Na siłę skurczu wpływa przede wszystkim liczba włókien mięśniowych jednostki, czyli wskaźnik unerwienia (Kanda i Hashizume, 1992; Parmiggiani i Stein, 1981). Można oczekiwać, że najslabsze jednostki ruchowe zajmują mniejsze terytorium w mięśniu i/lub ich włókna mięśniowe mają mniejszą gęstość. Zapewne z tymi faktami można wiązać obserwacje, że to właśnie dla takich słabych jednostek ruchowych częściej obserwowano efekt przejściowego spadku siły skurczu (Grzesiak i wsp., 2019). Natomiast relatywnie niską, mimo niewielkiej siły skurczu, częstość występowania badanego przejściowego spadku siły skurczu w przypadku jednostek ruchowych typu S można wiązać z ich znacznie niższą wrażliwością na zmiany w układzie pobudzeń (Grottel i Celichowski,

1999) oraz znacznie większą sztywnością (Petit i wsp., 1990). Z drugiej strony jednostki typu FF mają znacznie dłuższe włókna mięśniowe, dominujące głównie w dystalnym przedziale mięśniowym, charakteryzujące się niestabilną siłą skurczu. Ich siła skurczu początkowo dynamicznie się wzmacnia, a następnie w szybkim tempie maleje na skutek rozwoju zmęczenia (Gardiner i wsp., 1991; De Ruyter i wsp., 1996). Dodatkowo przedział dystalny jest znacząco dłuższy niż przedział proksymalny (który zawiera głównie jednostki ruchowe typu FR i S), co powoduje, że siła skurczu jednostek typu FF jest przekazywana na ścięgno poprzez znacząco krótsze elementy struktury mięśni (Taborowska i wsp., 2016).

Oprócz biernego rozciągnięcia mięśnia, koaktywacja innych jednostek ruchowych tego samego mięśnia, także przyczynia się do modyfikacji napięcia zaangażowanych w transmisję siły fragmentów sieci kolagenowej, co w myśl testowanej hipotezy, wpływa na procesy przenoszenia siły generowanej przez włókna mięśniowe czynnej jednostki ruchowej na ścięgno. Wpływ ten w odniesieniu do badanego zjawiska przejściowego spadku siły po redukcji częstotliwości stymulacji okazał się bardzo istotny. Opisywane badania wykazały, że gdy siła skurczu aktywowanej równocześnie grupy jednostek ruchowych przekracza 550 mN, efekt przejściowego spadku siły zanika. Średnia wartość siły maksymalnego skurczu tęczowego zupełnego dla pojedynczej jednostki ruchowej w badanym mięśniu wynosi 100,8 mN, średnia wartość siły mięśnia brzuchatego przysrodkowego łydki wynosi ok. 5,25 N, a w jednym mięśniu znajdują się przeciętnie 52 jednostki ruchowe (Celichowski i Drzymała-Celichowska, 2007). Sugeruje to, że podczas aktywności na poziomie około 10-15% siły mięśnia badane zjawisko może mieć już niewielki wpływ na przebieg siły skurczu.

Liczne badania wykazały, że siła generowana przez pobudzane jednostki ruchowe jest wrażliwa na wzorzec stymulacji, a wydłużenie lub skrócenie nawet jednej przerwy pomiędzy początkowymi lub kolejnymi dwoma bodźcami, może przyczynić się do modyfikacji dalszego przebiegu siły (patrz: Wprowadzenie). Mechanizmy tych efektów upatrywano w

zmianach poziomu wapnia uwalnianego do sarkoplazmy i/lub interakcji między miozyną oraz aktyną (tworzenie zmiennej liczby mostków) (Allen i wsp., 2008; Allen i Westerblad, 2001). Przeprowadzone badania dowiodły jednak, że dla wywołania opisywanego przejściowego spadku siły potrzebny jest dłuższy ciąg bodźców wysokiej częstotliwości (minimum 6). Dodatkowo, zastanawiający jest fakt, że opisywane zjawisko występowało tylko w części jednostek ruchowych wszystkich trzech typów, a jego występowanie wiązało się z mniejszą siłą skurczu jednostki (mniejszą liczbą włókien mięśniowych, a zapewne także ich rozmieszczeniem na niewielkim terytorium lub mniejszą gęstością włókien mięśniowych). Te wyniki sugerują, że przyczyny opisywanego zjawiska są odmienne od wspomnianych powyżej śródkomórkowych mechanizmów, co pośrednio potwierdza również sugerowany wpływ struktur kolagenowych w przenoszeniu siły na opisywany jej spadek.

Niedawno opisana metoda matematycznej dekompozycji skurczów tężcowych niezupełnych na pojedyncze odpowiedzi na kolejne pobudzenia (o kształcie skurczów pojedynczych), okazała się użytecznym narzędziem w badaniach procesów rozwoju siły skurczu jednostek ruchowych (Raikova i wsp., 2007) i została wykorzystana w przedstawianych badaniach. Wyniki analizy cech skurczów tych kolejnych odpowiedzi wykazały, że przejściowy spadek siły powiązany jest przede wszystkim ze skracaniem się czasu skurczu i spadkiem amplitud siły, natomiast przyrost siły skurczu jednostki ruchowej po spadku jest efektem wydłużania się czasu relaksacji. Te obserwacje przyczyniają się do pełniejszego zrozumienia mechanizmów związanych z badanym zjawiskiem.

W badaniach wyładowań jednostek ruchowych podczas skurczów dowolnych, z reguły będących efektem analiz rejestracji elektromiograficznych prowadzonych na ludziach, nie obserwuje się skokowego spadku lub wzrostu częstotliwości wyładowań jednostek ruchowych (jak zastosowano w opisywanych badaniach), ale wyraźnie można dostrzec płynne zmiany w aktywności motoneuronów podczas modulacji siły skurczu mięśni w

trakcie ruchów (Moritz i wsp., 2005; Person i Kudina, 1972). Te fakty zasugerowały potrzebę sprawdzenia, czy badany spadek siły może mieć miejsce podczas płynnych, a nie tylko podczas skokowych zmian częstotliwości stymulacji. Dla sprawdzenia tej hipotezy wykorzystana została stymulacja o sinusoidalnie zmieniającej się częstotliwości pobudzeń. Wyniki wykazały, że również podczas takiego stopniowego spadku częstotliwości stymulacji może pojawić się nadspodziewany spadek siły, co świadczy o możliwości występowaniu podobnego procesu w czasie skurczów dowolnych jednostek ruchowych, także u człowieka.

Uzyskane w opisywanych doświadczeniach wyniki stanowią rozszerzenie wiedzy w zakresie fizjologii i biomechaniki mięśni szkieletowych, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia czynności tych mięśni, a szczególnie roli układu wyładowań motoneuronów czynnych jednostek ruchowych w mięśniach człowieka. W wymiarze praktycznym wiedza może warunkować postęp w zakresie zabiegów elektrostymulacji mięśni, stosowanych m.in. u osób z chorobami nerwowo-mięśniowymi oraz u sportowców. Pewnym ograniczeniem opisywanych badań jest fakt, że obecnie nie ma ostatecznego wyjaśnienia mechanizmu opisywanego zjawiska. Pewien niedosyt w zakresie naukowym wiąże się także z tym, że badanego zjawiska nie testowano w innych mięśniach o różnej strukturze, co także może mieć istotny wpływ na procesy transmisji siły.

## **Wnioski**

Przeprowadzone badania wykazały obecność nieznanego wcześniej zjawiska przejściowego spadku siły skurczu po spadku częstotliwości pobudzeń, które występuje z różną częstością w przypadku wszystkich trzech typów jednostek ruchowych i powiązane jest ze stopniem wypełnienia skurczu tężcowego oraz siłą skurczu jednostek ruchowych. Zjawisko to ma podłoże biomechaniczne, zależne jest od czynników wpływających na stan napięcia kolagenu śródmięśniowego, jak rozciągnięcie mięśnia i aktywność innych jednostek



ruchowych w danym mięśniu, a do jego wywołania niezbędny jest znaczący przyrost siły wywołany przez co najmniej kilka bodźców o wysokiej częstotliwości. Potwierdzone występowanie badanego efektu spadku siły podczas płynnej (sinusoidalnej) zmiany częstotliwości stymulacji wskazuje, że opisywane zjawisko wpływa na skurcz mięśni w czasie ich aktywności dowolnej.

## Literatura

1. Adam A., De Luca C., Erim Z. Hand dominance and motor unit firing behaviour, *Journal of Neurophysiology* 80, 1373–1382, 1998
2. Allen D.G., Lamb D.G., Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms, *Physiological Reviews* 88(1), 287–332, 2008
3. Allen D.G., Westerblad H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue, *Journal of Physiology* 536(3), 657–665, 2001
4. Bawa P., Calancie B. Repetitive doublets in human flexor carpi radialis muscle, *Journal of Physiology* 339, 123–132, 1983
5. Boe S.G., Stashuk D.W., Brown W.F., Doherty T.J. Decomposition-based quantitative electromyography: effect of force on motor unit potentials and motor unit number estimates, *Muscle & Nerve* 31, 365–373, 2005
6. Burke R.E., Rudomin P., Zajac F.E. The effect of activation history of tension production by individual muscle units, *Brain Research* 109, 515–529, 1976
7. Celichowski J, Drzymała-Celichowska H. The number of MUs in the medial gastrocnemius muscle of male and female rats, *Journal of Physiology and Pharmacology* 58(4), 821–828, 2007
8. Celichowski J. Tetanic depression: a phenomenon influencing the production of tension in fast-twitch motor units in rat medial gastrocnemius, *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 61, 119-123, 2001
9. Celichowski J., Dobrzyńska Z., Łochyński D., Krutki P. The tetanic depression in fast motor units of mammalian skeletal muscle can be evoked by lengthening of one initial interpulse interval, *Experimental Brain Research* 214(1), 19-26, 2011
10. 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, *Archives Italiennes de Biologie* 130, 315–325, 1992

11. Celichowski J., Grottel K. The influence of a doublet of stimuli at the beginning of the tetanus on its time course, *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 58(1), 47-53, 1998
12. Celichowski J., Krutki P., Łochyński D., Grottel K., Mrówczyński W. Tetanic depression in fast motor units of the cat gastrocnemius, *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 291-303, 2004
13. 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, *Journal of Biomechanics* 41, 3448-3454, 2008
14. De Luca C.J., Erim Z. Common drive of motor units in regulation of muscle force, *Trends in Neurosciences* 17, 299–305, 1994
15. De Luca C.J., LeFever, R.S., McCue M.P., Xenakis A.P. Behaviour of human motor units in different muscles during linearly varying contractions, *Journal of Physiology* 329, 113–128, 1982
16. De Ruyter C.J., De Haan A., Sargeant A.J. Fast-twitch muscle unit properties in different rat medial gastrocnemius muscle compartments, *Journal of Neurophysiology* 75(6), 2243–2254, 1996
17. Frigon A., Thompson C.K., Johnson M.D., Manuel M., Hornby G., Heckman C.J. Extra forces evoked during electrical stimulation of the muscle or its nerve are generated and modulated by a length-dependent intrinsic property of muscle in human and cats, *Journal of Neuroscience* 31(15), 5579–5588, 2011
18. Fuglevand A.J., Zackowski K.M., Huey K.A., Enoka R.M. Impairment of neuromuscular propagation during human fatiguing contractions at submaximal forces, *Journal of Physiology* 460, 549–572, 1993
19. Gardiner P.F., Jasmin B.J., Corriveau P. Rostrocaudal pattern of fiber-type changes in an overloaded rat ankle extensor, *Journal of Applied Physiology* 71, 558–564, 1991
20. Garland S.J., Griffin L. Motor units double discharges: statistical anomaly or functional entity? *Canadian Journal of Applied Physiology* 24, 113–130, 1999
21. 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 Neurobiologiae Experimentalis* 50, 571-588, 1990
22. Grottel K., Celichowski J. The influence of changes in the stimulation pattern on force and fusion in motor units in the rat medial gastrocnemius muscle, *Experimental Brain Research* 127, 298-306, 1999

23. Grzesiak J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius, *Journal of Electromyography and Kinesiology* 46, 14–20, 2019
24. Henneman E. Relations between size of neurons and their susceptibility to discharge, *Science* 126, 1345–1346, 1957
25. Henneman E., Somjen G., Carpenter D.O. Functional significance of cell size in spinal motoneurons, *Journal of Neurophysiology* 28, 560–580, 1965
26. Herzog J.A., Leonard T.R., Jinha A., Herzog W. Are titin properties reflected in single myofibrils? *Journal of Biomechanics* 45(11), 1893-1899, 2012
27. Huijing P.A., Baan G.C., Rebel G.T. Non-myotendinous force transmission in rat extensor digitorum longus muscle, *Journal of Experimental Biology* 201, 683–691, 1998
28. Huijing P.A., Jaspers R.T. Adaptation of muscle size of myofascial force transmission: a review and some new experimental results, *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 15, 349–380, 2005
29. Kanda K., Hashizume K. Factors causing difference in force output among motor units in the rat medial gastrocnemius muscle, *Journal of Physiology* 448, 677–695, 1992
30. Kernell D., Eerbeek O., Verhey B.A. Relation between isometric force and stimulus rate in cat's hindlimb motor units of different twitch contraction time, *Experimental Brain Research* 50, 220-227, 1983
31. Masuda T., De Luca C.J. Recruitment threshold and muscle fiber conduction velocity of single motor units, *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2, 116–123, 1991
32. Meijer H.J.M. Aspects of epimuscular myofascial force transmission: a physiological, pathological and comparative-zoological approach. Amsterdam. Thesis 2007
33. Moritz C.T., Barry B.K., Pascoe M.A., Enoka R.M. Discharge rate variability influences the variation in force fluctuations across the working range of a hand muscle, *Journal of Neurophysiology* 93, 2449–2459, 2005
34. Parmiggiani F., Stein R.B. Nonlinear summation of contraction in cat muscles. II. Later facilitation and stiffness changes, *Journal of General Physiology* 78, 295–311, 1981
35. Person R.S., Kudina L.P. Discharge frequency and discharge pattern of human motor units during voluntary contraction of muscle, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 32, 471–483, 1972

36. Petit J., Filippi G.M., Emonet-Dénand, F., Hunt C.C., Laporte, Y. Changes in muscle stiffness produced by motor units of different types in peroneus longus muscle of cat, *Journal of Neurophysiology* 63, 190–197, 1990
37. Raikova R., Celichowski J., Pogrzebna M., Aladjov H., Krutki P. Modeling of summation of individual twitches into unfused tetanus for various types of rat MUs, *Journal of Electromyography and Kinesiology* 17(2), 121–30, 2007
38. Rakoczy J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Raikova R., Celichowski J. Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate, *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation* 12(1), 60, 2020
39. Taborowska M., Bukowska D., Drzymała-Celichowska H., Mierzejewska-Krzyżowska B., Celichowski J. Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius, *Somatosensory & Motor Research* 33(3–4), 200–208, 2016
40. Westergaard R.H., De Luca C.J. Motor control of low-threshold motor units in the human trapezius muscle, *Journal of Neurophysiology* 85, 1777–1781, 2001

## II. Streszczenie

**Wprowadzenie:** W literaturze znanych jest wiele zjawisk związanych z procesami regulacji siły skurczu jednostek motorycznych oraz sumowaniem skurczowych odpowiedzi jednostek na kolejne pobudzenia ze strony motoneuronu wykazujących, że proces kodowania siły jednostek ruchowych przez częstotliwość wyładowań motoneuronów ma charakter nieliniowy. Prezentowane wyniki doświadczeń dotyczą nieopisanego wcześniej zjawiska przejściowego spadku siły po obniżeniu częstotliwości pobudzeń z wysokiej do niskiej, występującego w skurczach tężcowych niezupełnych jednostek ruchowych mięśnia szkieletowego.

**Metody badawcze:** Doświadczenia były przeprowadzane na mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki samic szczurów w narkozie pentobarbitalowej. Badano jednostki ruchowe trzech typów: FF (ang. *fast fatigable*) – szybkie, nieodporne na zmęczenie, FR (ang. *fast resistant to fatigue*) – szybkie, odporne na zmęczenie oraz S (ang. *slow*) – wolne. Czynnościowa izolacja jednostek ruchowych bazowała na metodzie rozdzielania korzeni brzusznych na cienkie wiązki aksonów, które były stymulowane impulsami elektrycznymi. Badany efekt spadku siły testowano w trójfazowych układach bodźców o niskiej-wysokiej-niskiej częstotliwości na 283 jednostkach ruchowych trzech typów.

**Cel badań:** Badania miały na celu opisanie zjawiska przejściowego spadku siły po skokowym obniżeniu częstotliwości pobudzeń oraz wyjaśnienie jego podłoża.

**Wyniki badań:** W pierwszej części badań wykazano, że zjawisko przejściowego spadku siły skurczu po obniżeniu częstotliwości pobudzeń z wysokiej do niskiej występowało w przypadku niemal połowy jednostek ruchowych badanego mięśnia i było widoczne dla jednostek wszystkich trzech typów. Najczęściej jednak zjawisko to było obserwowane w przypadku jednostek typu FR, dla których miało również największą amplitudę. Dodatkowo,

badany spadek siły występował częściej dla jednostek ruchowych o niższej sile. Ponadto, zależał on od stopnia wypełnienia skurczu tężcowego i był najsilniejszy w przypadku skurczów o stopniu wypełnienia w granicach 0,5-0,9.

W drugiej części badań wykazano znaczący wpływ rozciągnięcia mięśnia na występowanie badanego zjawiska. Najsilniej zaznaczony przejściowy spadek siły odnotowywano podczas rozciągnięcia mięśnia z siłą optymalną dla rozwinięcia największej siły skurczu jednostek ruchowych, wynoszącą 100 mN. Zaobserwowano również wpływ równoległego skurczu tężcowego jednej lub kilku jednostek ruchowych na badane zjawisko. W przypadku, gdy siła takiego równoległego skurczu przekraczała 550 mN, opisywane zjawisko w znaczącym stopniu zmniejszało się lub było całkowicie znoszone. Natomiast w przypadku równoległych skurczów innych jednostek o sile niższej niż 550 mN obserwowano zmienne efekty: obniżenie lub wzrost amplitudy badanego spadku siły. Badanie minimalnej liczby bodźców o wysokiej częstotliwości, niezbędnej do wywołania badanego zjawiska wykazało, że występowało się ono wyraźnie, gdy zastosowano co najmniej 6 bodźców o wysokiej częstotliwości, a skrócenie tylko jednego odstępu pomiędzy pobudzeniami nie przyczyniało się do jego występowania. W kolejnej serii eksperymentów, w której stosowano sinusoidalnie zmieniającą się częstotliwość stymulacji dowiedziono, że przejściowy spadek siły występuje również podczas płynnego spadku częstotliwości pobudzeń. Dodatkowo, matematyczna dekompozycja skurczu tężcowego z opisywanym zjawiskiem przejściowego spadku siły wykazała, że zjawisko to jest efektem spadku siły oraz skrócenia czasu skurczu w odpowiedzi na kolejne pobudzenia, a dalszy wzrost siły wynika z wydłużania czasu relaksacji.

**Wnioski:** Zjawisko przejściowego spadku siły skurczu po obniżeniu częstotliwości pobudzeń występowało z różną częstością wśród trzech typów jednostek ruchowych i powiązane jest ze stopniem wypełnienia skurczu tężcowego oraz siłą skurczu jednostek ruchowych. Zjawisko

to ma podłoże biomechaniczne, zależne jest od czynników wpływających na rozkład napięcia w obrębie mięśnia, jak jego rozciągnięcie i aktywność innych jednostek ruchowych w mięśniu. Do wywołania badanego efektu niezbędny jest znaczący przyrost siły wywołany przez co najmniej kilka bodźców o wysokiej częstotliwości. Występowanie badanego efektu spadku siły podczas płynnych zmian częstotliwości stymulacji wskazuje, że opisywane zjawisko jest zapewne jednym z czynników wpływających na skurcz mięśni w czasie ich aktywności dowolnej.

**Słowa kluczowe:** jednostki ruchowe, skurcz tężcowy niezupełny, regulacja siły, częstotliwość stymulacji

### **III. Abstract**

**Introduction:** There are numerous phenomena related to force regulation and summation of the responses of motor units to successive motoneuronal firings, which show that the processes of force regulation by frequency of motoneurons discharges are nonlinear. The presented experimental results concern the previously unknown phenomenon of the transitory force decrease evoked by a sudden reduction in the stimulation frequency from high to low, occurring in unfused tetanic contractions of motor units.

**Methods:** The experiments were performed on the medial gastrocnemius muscle of female rats under pentobarbital anesthesia. Three types of motor units were investigated: FF - fast fatigable, FR - fast resistant to fatigue, S - slow. The functional isolation of motor units was based on splitting the ventral roots into the thinnest possible filaments, which were stimulated by electrical impulses. The investigated effect was tested with three-phase trains of stimuli with low-high-low frequency pattern on 283 motor units of three types.

**Aims:** The aim of the study was to describe the phenomenon of the transitory force decrease following the reduction in the stimulation frequency and to explain the background of this effect.

**Results:** The first part of the study showed that the phenomenon of the transitory force decrease occurred in almost a half of motor units and was noticed for three types of motor units. This phenomenon was most often observed for units of FR type, for which it also had the highest amplitude. The examined effect was more frequent for weaker motor units of each type. Moreover, it depended on the fusion index degree and was the strongest when the fusion index ranged 0.5-0.9.



In the second part of the study a significant effect of muscle stretching on the amplitude of the studied phenomenon was demonstrated and the effect occurred most frequently when the muscle was stretched with 100 mN, the passive force optimal to develop the strongest twitch of motor units. When the effect of parallel tetanic contraction of one or more motor units was tested it was observed that when the force exceeded 550 mN the described phenomenon was significantly reduced or even completely abolished. However, when the force of parallel motor units was below 550 mN, variable effects were observed: decrease or increase in the amplitude of the studied force decrease. The analysis of the minimum number of high-frequency stimuli necessary to evoke this effect showed that the studied phenomenon appeared usually when at least 6 impulses of high-frequency stimuli were applied whereas shortening of only one interpulse interval did not evoke the studied effect. The other series of experiments, using sinusoidal changes in stimulation frequency revealed that this effect was also present at progressive decrease in the stimulation frequency. Finally, mathematical decomposition of tetanic contractions with the studied effect of the transitory force decrease into a series of twitch-shape responses to successive stimuli was performed and it was shown that this phenomenon is the result of a force decrease and a shortening in contraction time of successive responses whereas a further force restitution was related to the prolongation of relaxation.

**Conclusions:** The phenomenon of transitory force decrease after sudden reduction in the stimulation frequency occurs for all three types of motor units, however with different occurrence frequency and is related to both, the force and the fusion degree of tetanic contraction. This phenomenon has a biomechanical background, it depends on factors influencing the passive of tension within the muscle, such as stretch and the activity of other motor units in the muscle. A significant force increase caused by at least a few high-frequency stimuli is necessary to produce the studied effect. The occurrence of the studied

effect of the force decrease during a sinusoidal change of the stimulation frequency indicates that the described phenomenon may be one of the factors influencing the muscle force during voluntary activity.

**Keywords:** motor units, tetanic contraction, force regulation, stimulation frequency

#### **IV. Załączniki**

- Oświadczenia współautorów
- Grzesiak i wsp., 2019 (Artykuł nr 1)
- Rakoczy i wsp., 2020 (Artykuł nr 2)

dr Katarzyna Kryściak  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Grzesiak J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. **Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius**, Journal of Electromyography and Kinesiology 46, 14–20, 2019; doi: 10.1016/j.jelekin.2019.02.008; impact factor - 1.740; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na realizacji eksperymentów, gromadzeniu i analizie wyników badań, opracowaniu i weryfikacji tekstu publikacji.

  
Katarzyna Kryściak

dr hab. prof. AWF Hanna Drzymała-Celichowska  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

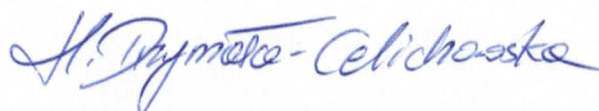
### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Grzesiak J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. **Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius**, Journal of Electromyography and Kinesiology 46, 14–20, 2019; doi: 10.1016/j.jelekin.2019.02.008; impact factor - 1.740; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na realizacji eksperymentów, analizie wyników badań, weryfikacji tekstu publikacji.

Hanna Drzymała-Celichowska



prof. dr hab. Jan Celichowski  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Grzesiak J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. **Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius**, Journal of Electromyography and Kinesiology 46, 14–20, 2019; March 2, 2019; doi: 10.1016/j.jelekin.2019.02.008; impact factor - 1.740; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji pracy badawczej, realizacji eksperymentów, gromadzeniu i analizie wyników badań, opracowaniu i weryfikacji tekstu publikacji.

  
Jan Celichowski

dr Katarzyna Kryściak  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

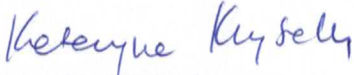
Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Rakoczy J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Raikova R., Celichowski J. **Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate**, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation 12(1):60, 2020; doi: 10.1186/s13102-020-00208-6; impact factor – 1.979; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na realizacji eksperymentów, gromadzeniu i analizie wyników badań, opracowaniu i weryfikacji tekstu publikacji.

  
Katarzyna Kryściak

dr hab. Prof. AWF Hanna Drzymała-Celichowska  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

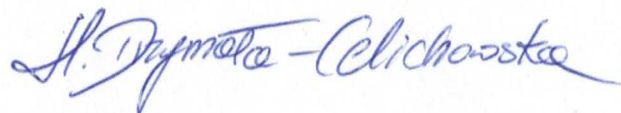
### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Rakoczy J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Raikova R., Celichowski J. **Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate**, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation 12(1):60, 2020; doi: 10.1186/s13102-020-00208-6; impact factor – 1.979; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na realizacji eksperymentów, analizie wyników badań, weryfikacji tekstu publikacji.

Hanna Drzymała-Celichowska





Prof. Rositsa Raikova PhD

Sofia, 2021-02-22

Institute of Biophysics and Biomedical Engineering

Bulgarian Academy of Sciences

To whom it may concern

I confirm that as an author of the article:

J. Rakoczy, K. Kryściak, H. Drzymała-Celichowska, R. Raikova, J. Celichowski. Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate. BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation. 2020, 12:60 DOI: 10.1186/s13102-020-00208-6

I have prepared the mathematical decomposition of tetanic contraction with the transitory force decrease into a series of twitch-like responses to successive stimuli as well as I have described this procedure, read and accepted the final version of the manuscript.



Profesor Rositsa Raikova

prof. dr hab. Jan Celichowski  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu  
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

Poznań, 22.02.2021 r.

Dotyczy wniosku o przeprowadzenie postępowania doktorskiego mgr Joanny Rakoczy

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w pracy:

Rakoczy J., Kryściak K., Drzymała-Celichowska H., Raikova R., Celichowski J. **Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate**, BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation 12(1):60, 2020; doi: 10.1186/s13102-020-00208-6; impact factor – 1.979; punktacja ministerstwa – 100 pkt.

mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji pracy badawczej, realizacji eksperymentów, gromadzeniu i analizie wyników badań, opracowaniu i weryfikacji tekstu publikacji.



Jan Celichowski



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Electromyography and Kinesiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jelekin](http://www.elsevier.com/locate/jelekin)

## Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in motor units of rat medial gastrocnemius

Joanna Grzesiak\*, Katarzyna Kryściak, Hanna Drzymała-Celichowska, Jan Celichowski

Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, Poland



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Motor unit  
Unfused tetanus  
Rate coding  
Force regulation  
Stimulation frequency

## ABSTRACT

Effects of a sudden decrease in the stimulation frequency for motor unit force were studied in rat medial gastrocnemius. For 161 functionally isolated single motor units of three types (S, FR, FF), unfused tetanic contractions were evoked by three-phase trains of stimuli (low–high–low frequency). The course of the tetanus at the onset of the third phase of the force recording was analyzed in tetani with variable fusion degree. For 78 units within the third phase of tetanus, a transitory force decrease to a level lower than in the first phase (identical frequency), was observed. This phenomenon was more frequent for fast fatigue resistant (65.9%) than for fast fatigable and slow motor units (27.1% and 35.5%, respectively). Moreover, the force decrease was strongest for fast resistant motor units (up to 36.5%) and when contractions evoked at variable frequencies of stimulation were compared, the highest amplitudes of the studied force decrease were noted for middle-fused tetani (0.50–0.90). A new phenomenon of transitory force decrease in tetanic contractions of motor units with a decrease in stimulation frequency was found. Most probably, the phenomenon is dependent on disturbances in the force transmission by collagen surrounding active muscles fibers.

## 1. Introduction

In classical experiments, the force of motor units evoked by trains of stimuli at several constant frequencies of stimulation was measured and the sigmoid-shape force–frequency relationship was presented (Kernell et al., 1983; Reinking et al., 1975). However, the force regulation is a complex process, dependent also on changes in instantaneous or mean stimulation frequency (MacIntosh et al., 2007). The history of preceding motor unit activity considerably influences the force production. Several phenomena related to the effects of specific patterns of stimuli were described. First, when motoneurons begin the activity with a doublet, i.e., two action potentials at a short (up to 10 ms) time interval (Garland and Griffin, 1999; Person and Kudina, 1972) the doublet causes a rapid increase in developed force, known as the catch effect (Binder-Macleod and Clamann, 1989; Burke et al., 1976; Sandercock and Heckmann, 1997). This phenomenon was observed in fast (F) and slow (S) motor units. In other experiments, the force development at linearly increasing and decreasing frequencies of stimulation was studied and the hysteresis in the force–frequency relationships (at increasing and decreasing stimulation frequency) was observed. In addition, the force was also compared with values measured at a constant-rate stimulation, at given frequencies. When motor units were activated with trains of pulses at linearly decreasing frequency, the force decrease

was slower than expected when compared with the constant stimulation frequency (Clamann and Schelhorn, 1988). On the other hand, it is worth emphasizing that at linearly increasing stimulation rate, the force increase was slower than expected (Binder-Macleod and Clamann, 1989; Frigon et al., 2011). This effect is related to a later-described phenomenon: reduction in the force at a constant frequency of stimulation conditioned by initial activation at lower frequency (Celichowski et al., 2004). The force reduction, reported as tetanic depression, was noted for fast motor units and was observed even when only one interpulse interval was prolonged (Celichowski, 2000; Grottel and Celichowski, 1999).

The catch effect and tetanic depression are effects of changes in the stimulation frequency at the onset of activity. However, the effects of a decrease in the activation frequency during evoked activity of motor units have not been studied before. During preliminary experiments, testing effects of a decrease in the stimulation frequency (a switch from high to low frequency), we unexpectedly found for a part of the motor units a sudden decrease in the force. Namely, the motor unit force temporarily decreased to a level lower than expected for the reduced stimulation frequency. This observed phenomenon potentially influences motor unit force when motoneurons are reducing their activity. Therefore, the aim of the present study was to recognize the occurrence of this force decrease in the three types of motor units, define the

\* Corresponding author at: Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, 27/39 Królowej Jadwigi Street, 61-871 Poznań, Poland.  
E-mail address: [joanna.grzesiak2904@gmail.com](mailto:joanna.grzesiak2904@gmail.com) (J. Grzesiak).

amplitude of the force decrease, and its dependence on the fusion degree of tetanic contractions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The experiments were performed on 11 female Wistar rats (4–5 months old), of mean body mass  $254.6 \pm 17.0$  g. Rats were kept in standard laboratory cages (two per cage) in an animal house with a 12:12 light/dark cycle, controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ). All rats had unrestricted access to standard laboratory food and tap water throughout the study period, ensuring a balanced nutrient diet.

All procedures were approved by the Local Ethics Committee for Experiments on Animals (Permission Number: 2/2015) and were conducted in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences, the Polish Law on the Protection of Animals as well as EU regulations. All experiments were performed under anesthesia and all efforts were made to minimize the suffering of examined animals.

### 2.2. Surgery

Animals were deeply anesthetized throughout the experiments with sodium pentobarbital (initial dose of 60 mg/kg i.p.) and the depth of anesthesia was monitored by controlling pinna and withdrawal reflexes. The studied medial gastrocnemius muscle was carefully separated from surrounding tissues, while the supplying blood vessels and nerve branches were left intact. Remaining collaterals of the sciatic nerve were cut. Laminectomy was made over five lumbar and sacral vertebrae (L2–S1). The dura mater over the spinal cord was cut and retracted. Rats were immobilized through L1 and S1 vertebrae with steel clamps and the hind limb was stabilized with an additional clamp on the tibia in a chamber filled with oil and the temperature was kept automatically at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . At the end of the experiment, animals were euthanized with sodium pentobarbital (180–200 mg/kg, i.p.).

To evoke an isolated activity of motor units, the ventral roots of L4–L5 spinal nerves were cut close to the spinal cord and split into the thinnest possible filaments. Filaments, containing bundles of axons, were then electrically stimulated by a bipolar silver electrode with electrical rectangular pulses (amplitude up to 0.5 V, duration 0.1 ms) produced by a dual channel square pulse stimulator (model S88, Grass Instrument Company) to evoke a contractile activity in a studied muscle; all remaining muscles of the hind limb were denervated. The “all-or-none” appearance of twitch contraction and action potential evoked when each of separated filament was stimulated with stimuli of amplitude around and twice above the threshold were accepted as criteria of a single motor unit isolation.

Force and electromyogram were monitored on an oscilloscope and stored on a computer disk using an analog-to-digital converter (sampling rate of 1 kHz for force and 10 kHz for action potentials).

During recordings, the Achilles tendon of the medial gastrocnemius was connected to the inductive force transducer (custom-made model: FT-100A, deflection of recording elements of  $100 \mu\text{m}$  per 100 mN). The force generated by active motor units were recorded under isometric conditions. The muscle was stretched up to 100 mN tension, optimal to attain the highest contractile force for single motor units (Celichowski and Grottel, 1992). The action potentials were recorded with a silver-wire electrode (not insulated,  $150 \mu\text{m}$  in diameter) inserted into a muscle perpendicularly to its long axis, whereas the reference electrode was placed on denervated hip muscles.

### 2.3. Stimulation protocol

When the isolation of a single motor unit was reached, the following stimulation protocol was applied:

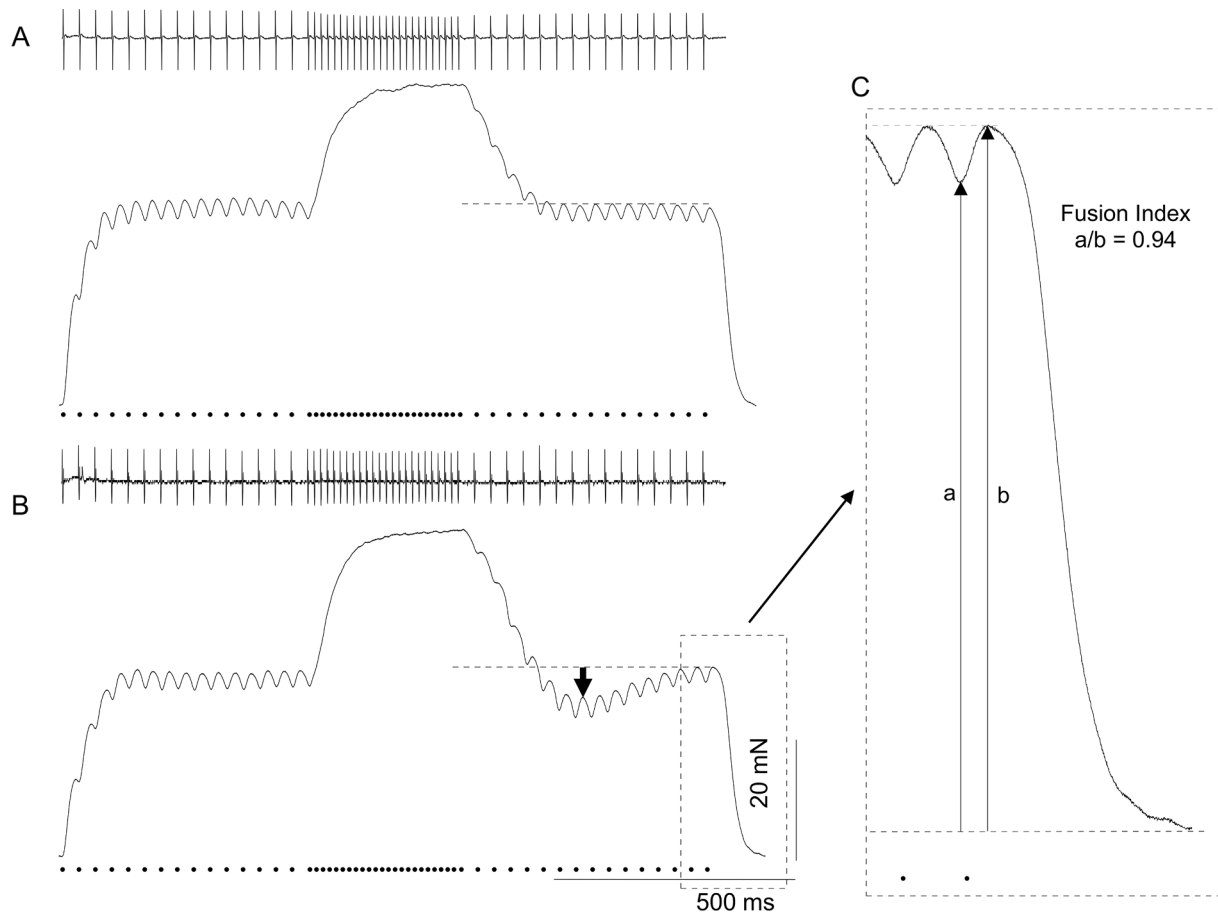
- 5 pulses at 1 Hz (the force of five evoked twitches and action potentials were recorded and averaged);
- 500 ms train of pulses at 40 Hz (the force of unfused tetanus was recorded and the presence of “sag” was verified);
- 300 ms train of pulses at 150 Hz (the fused tetanus was recorded and the maximum force was determined);
- the main recordings of tetanic contractions evoked with three-phase trains of pulses at changing frequencies in a general pattern: low–high–low frequency (Fig. 1).
  - For F motor units, the protocol based on the following stimulation pattern was applied: 500 ms train of stimuli at low frequency, 300 ms at high frequency and 500 ms at the same low frequency as the initial. The low frequencies were 15, 20, 25, 30, 35 and 40 Hz, and high frequencies were 75, 90 and 150 Hz and all possible combinations of low and high frequencies were tested, i.e., this stimulation protocol included 18 trials;
  - For S motor units, the stimulation pattern was matched to longer twitch time parameters and trains were longer because the plateau phase of S motor units tetanic contractions is reached in a longer time. Therefore, 1000 ms train of stimuli at low frequency, 300 ms at high frequency and 1000 ms at the same low frequency as the initial stimuli were applied. The low frequencies were 10, 12.5, 15, 17.5, 20 and 25 Hz and high frequencies were 30, 40 and 50 Hz and all possible combinations of low and high frequencies were tested, i.e., this stimulation protocol included 18 trials.
- the fatigue test, i.e., trains of 14 pulses at 40 Hz repeated every second during 3 min (the recordings were used to calculate the fatigue index) (Burke et al., 1973; Kernell et al., 1983).

All force recordings within the above points of the stimulation protocol were separated by 10-second intervals.

### 2.4. Studied parameters

The basic contractile properties of 161 motor units were investigated (31 slow motor units (S), 82 fast resistant motor units (FR) and 48 fast fatigue motor units (FF). The twitch force (TwF, measured from the baseline to peak force), the contraction time (CT, measured as a time from the onset of force recording to the highest amplitude of twitch force), the half-relaxation time (HRT, measured between the peak of the twitch force and half of this value) were calculated from the average twitch force profile. Then, for the fused tetanus (third step of the stimulation protocol at 150 Hz stimulation) the maximum tetanus force (TetF, from the baseline to the peak of contraction) was measured, and the ratio of the twitch-to-tetanus forces (TwF/TetF) was calculated. Finally, the fatigue index (FatI) was calculated on a basis of the fatigue test, as a ratio of the tetanus force generated 2 min after the most potentiated contraction at the beginning of the fatigue test to the highest initial force. Motor units were classified into F and S based on the presence of sag in 40 Hz contraction: in fast units, a sag phenomenon was visible in unfused tetani evoked at 40 Hz (the second step of the stimulation protocol) whereas the sag was not observed in S motor units (Burke et al., 1973). The further division of fast motor units was based on the fatigue index, which was below 0.5 for FF and above 0.5 for FR motor units (Grottel and Celichowski, 1990; Kernell et al., 1983).

The main studied parameter, in the fourth step of the stimulation



**Fig. 1.** Calculation of the amplitude of the transitory force decrease and fusion index. The sample recordings of the tetanic contraction for two FR motor units (A and B) stimulated with the same 30–75–30 Hz frequency pattern. The distribution of applied stimuli is indicated by dots under the force recordings. Trains of motor units action potentials are indicated above the force. Transitory force decrease (indicated by bold arrow) following the sudden reduction in stimulation frequency is visible only in (B). The horizontal interrupted line indicates the reference force value at the end of tetanus used for the amplitude of the force decrease calculation. The enlarged part of recording in (C) shows the method of the fusion index calculation (a/b).

protocol, was an amplitude of the transitory force decrease at the beginning of the third phase of the force recording (Fig. 1B, bold arrow). The amplitude was determined as a difference from the reference force at the end of the last phase of the three phases of tetanus. The presence of a phenomenon in the recording was accepted when the amplitude of the force decline exceeded 3% of the force recorded at the end of the

last phase of stimulation.

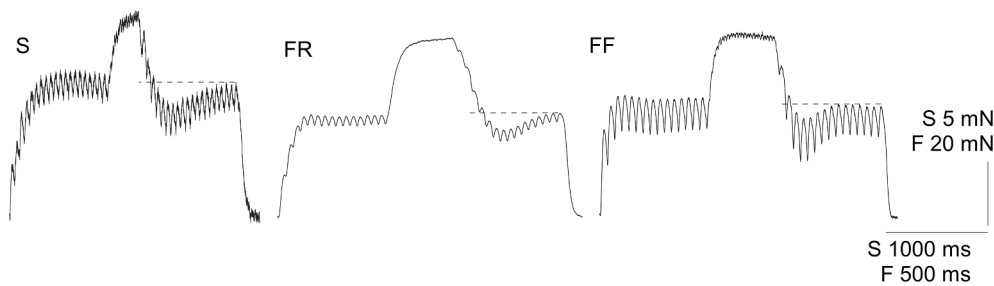
Finally, the fusion index (FuI) was determined as a ratio of the lowest force value before the last stimulus in the third phase (the second low stimulation phase) of stimulation (a in Fig. 1C) to the peak force following the last stimulus (b in Fig. 1C).

**Table 1**

Basic contractile properties (mean  $\pm$  SD) of the three types of motor units (S, FR, FF). Motor units of each type were subdivided into two groups: with transitory force decrease (+) and without this phenomenon (-).

Type of MUs	CT [ms]	HRT [ms]	TwF [mN]	TetF [mN]	TwF/TetF
S (+)	24.7 $\pm$ 2.5 (21–31)	35.6 $\pm$ 4.9 (30–42)	5.4 $\pm$ 1.6 (2.2–7.8)	42.8 $\pm$ 9.8 (24.9–56.3)	0.12 $\pm$ 0.02 (0.09–0.17)
S (-)	23.5 $\pm$ 2.7 (19–29)	33.0 $\pm$ 3.4 (27–42)	4.7 $\pm$ 1.9 (1.7–9.2)	42.5 $\pm$ 13.1 (19.6–60.5)	0.10 $\pm$ 0.03 (0.08–0.16)
FR (+)	15.4 $\pm$ 3.7 <sup>†</sup> (11–20)	18.0 $\pm$ 4.9 (11–30)	21.3 $\pm$ 15.6 <sup>*</sup> (4.7–69.7)	91.5 $\pm$ 47.1 <sup>*</sup> (27.3–217.8)	0.22 $\pm$ 0.09 (0.08–0.50)
FR (-)	14.1 $\pm$ 2.2 (10–20)	17.4 $\pm$ 4.3 (10–29)	35.8 $\pm$ 25.5 (7.5–87.1)	130.5 $\pm$ 63.9 (21.6–246.4)	0.26 $\pm$ 0.13 (0.12–0.57)
FF (+)	13.4 $\pm$ 1.3 (10–16)	17.0 $\pm$ 2.6 (14–23)	52.4 $\pm$ 32.2 <sup>†</sup> (12.9–131.2)	154.9 $\pm$ 55.1 <sup>†</sup> (79.5–248.3)	0.33 $\pm$ 0.12 (0.16–0.54)
FF (-)	12.6 $\pm$ 1.6 (10–16)	16.0 $\pm$ 3.2 (10–23)	81.7 $\pm$ 41.4 (12.2–168.4)	208.5 $\pm$ 85.3 (80.7–378.1)	0.36 $\pm$ 0.11 (0.12–0.51)

MUs, motor units; CT, contraction time; HRT, half relaxation time; TwF, twitch force; TetF, tetanus force; TwF/TetF, the ratio between twitch and tetanus force; S, slow motor unit; FR, fast resistant motor unit; FF, fast fatigable motor unit; (+), phenomenon of force decrease; (-), without phenomenon of force decrease. Statistical significance between groups (+) and (-) is represented by <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  (U Mann-Whitney) or <sup>†</sup>  $p > 0.05$  (the Student's *t*-test).



**Fig. 2.** Sample recordings of tetanic contractions of the three types of motor units. Stimulation patterns: 20–50–20 Hz; 30–75–30 Hz; 30–75–30 Hz for S, FR and FF motor unit, respectively. The horizontal interrupted line indicates the reference force value at the end of tetanus used for the amplitude of the force decrease calculation. Note that the transitory force decrease after high-frequency stimulation is visible in all presented recordings.

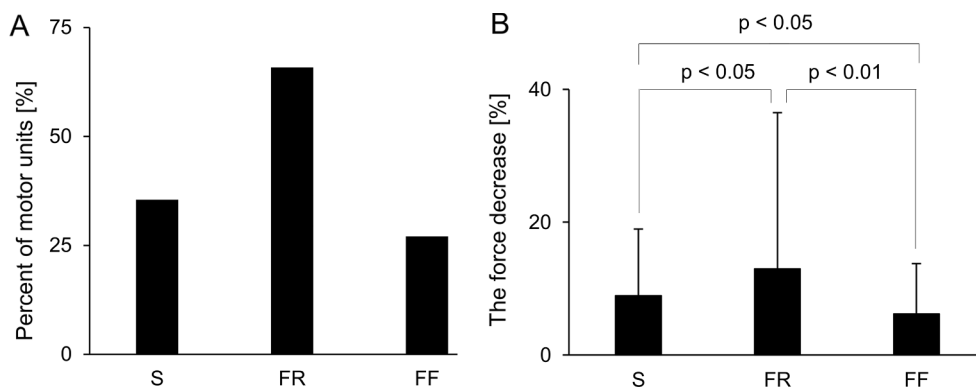
**2.5. Statistical methods**

The data are presented as mean ± SD. The basic contractile properties of examined motor units were submitted to statistical analysis using the Shapiro–Wilk test verifying the normal distribution for small groups. In addition, the results were statistically verified using Levene’s test to determine the homogeneity of the examined three types of motor units (FF, FR, S) with the division into two groups; first, with the force decrease effect (+) and second, without the force decrease effect (–) (see Table 1). Results for the three types of motor units were compared: when the results were inhomogeneous ( $p < 0.05$ ) nonparametric Mann–Whitney  $U$  test was used, otherwise (when the group was homogeneous) ( $p > 0.05$ ) Student’s  $t$  test was used. The differences in studied force decrease between the three types of motor units have been examined using nonparametric Kruskal–Wallis and post hoc Dunn’s tests. In addition, the dependence between transitory force decrease and FuI (for each of the three types of motor units) was determined (Pearson correlation coefficient).

**3. Results**

The transitory force decrease after the sudden reduction in stimulation frequency in low–high–low stimulation pattern occurred in all three types of motor units in rat medial gastrocnemius muscle (Fig. 2 and Table 1), for approximately 48.5% (78 of 161) of motor units, however, the distribution of units with visible phenomenon was different between the three types. Transitory force decrease was noted for 54 of 82 (65.9%) examined FR units, but it occurred in only 13 of 48 (27.1%) FF motor units and 11 of 31 (35.5%) S motor units (Fig. 3A). The mean amplitude of force decrease was the highest for FR motor units (FR to FF  $p < 0.01$ , FR to S  $p < 0.05$ , FF to S  $p < 0.05$ ) (Fig. 3B). The average force decrease for FR units was 13.0% of the reference force at the end of tetanus, with the maximum at 36.5%, whereas for S and FF units it was 8.9% (maximum 19.0%) and 6.2% (maximum 13.8%), respectively. It is worth noting that the transitory force decrease was not accompanied by changes in the motor unit action potentials (Fig. 1).

In addition, the analysis of basic contractile properties for the three types of motor units indicated that motor units that revealed the studied



**Fig. 3.** The occurrence frequency and amplitudes of the transitory force decrease for the motor units. (A) Proportion of the S, FR and FF motor units with the transitory force decrease (exceeding 3% of the reference force at the end of tetanus) after a sudden reduction in stimulation frequency at low–high–low sequence; (B) The mean values and SD of the amplitude of transitory force decrease (expressed in percent of the force at the end of the tetanus for S, FR and FF motor unit). The clamps indicate significant differences (post hoc Dunn’s test).

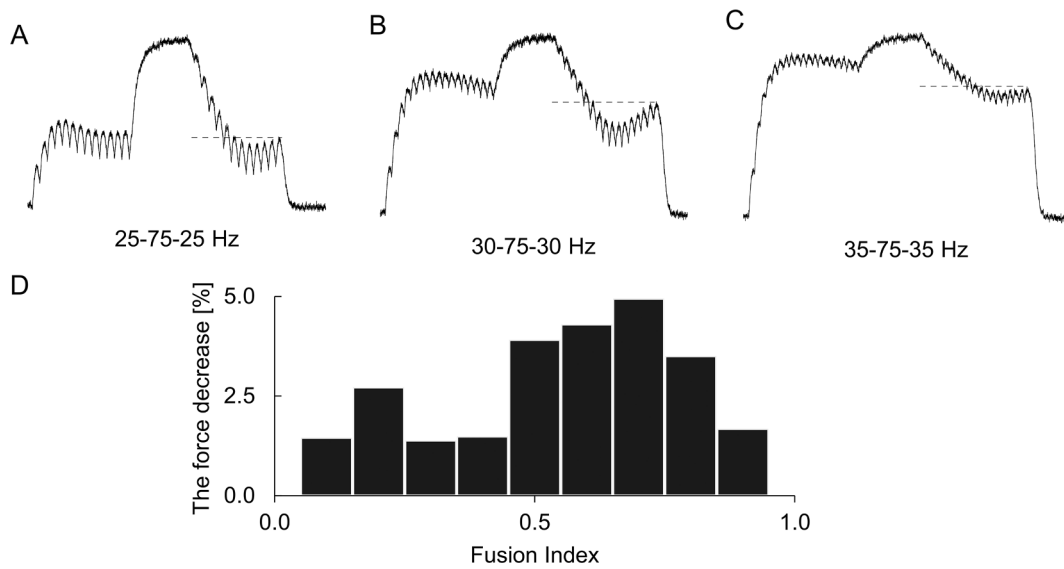
force decrease following the high-frequency stimulation phase (+) were characterized by longer contraction time (difference significant for FR motor units,  $p < 0.05$ ). The twitch and tetanus forces were lower in FR and FF motor units with the transitory force decrease (differences significant,  $p < 0.05$ ) (Table 1).

The dependence between the amplitude of the transitory force decrease and the fusion index was analyzed (Fig. 4A–C). For each of the three types of motor units, the force decrease did not correlate with the fusion index when data for all recorded tetani were taken together ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, the highest force decrease was recorded for contractions with the fusion index in a range of 0.50–0.90 (Fig. 4D). Whenever the studied effect was analyzed for several tetanic contractions of the same motor unit, it was absent in tetani with too low and too high values of the fusion index (Fig. 5). Differences in the middle, high frequency of stimulation did not influence the following transitory force decrease (Fig. 6). When amplitudes of the force decrease obtained for contractions of FR motor units with the middle high-frequency stimulation of 75, 90 and 150 Hz were compared, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between these three types of high-frequency stimulations. Conversely, low stimulation frequencies in contractions with the strongest force decrease appeared to be different for the three motor unit types. For FF and FR motor units, the strongest studied effect was observed for low frequencies of the pattern in a range of 20–40 Hz, with the highest decrease recorded usually at 30 Hz (Fig. 4B). For S motor units the highest effect was noted for considerably lower stimulation frequencies than for F motor units as the strongest effect was observed in a range of 15–25 Hz.

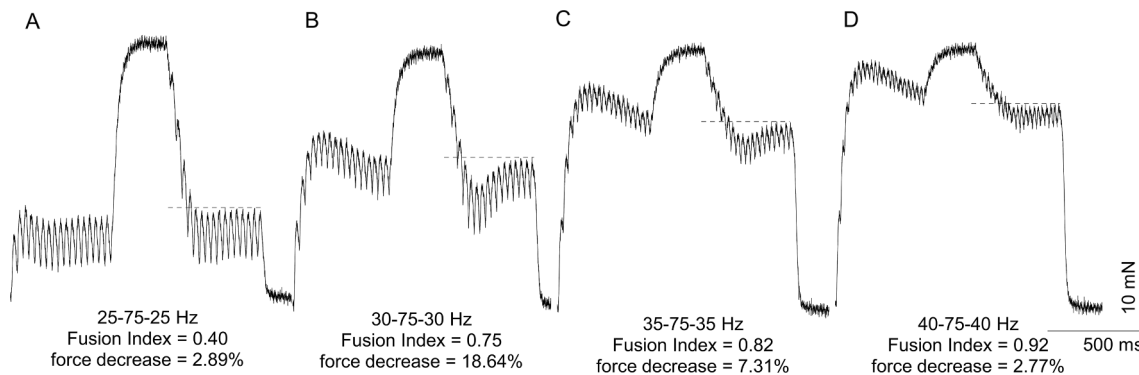
**4. Discussion**

During voluntary contractions, muscle force is controlled by the central nervous system in two fundamental ways: recruitment of motor units (Henneman, 1957; Henneman et al., 1965) and changes in motoneuronal firing rate (rate coding) (De Luca and Erim, 1994; De Luca et al., 1982; Person and Kudina, 1972). The described phenomenon of a transitory force decrease is directly related to the second mechanism as it potentially influences force production during a phase with decreasing firing rate of motoneurons.

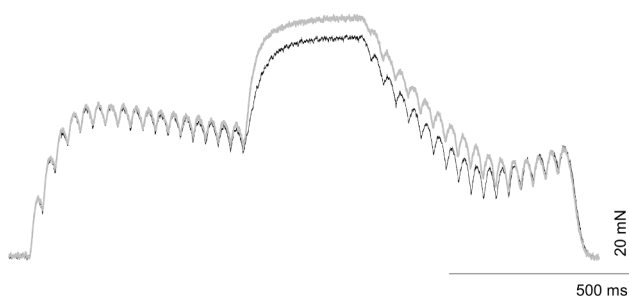
The observation highlights that the rate coding mechanism is a



**Fig. 4.** The dependence of the transitory force decrease on the fusion degree of a tetanus. The examples of one FR motor unit contraction with a transitory force decrease for three stimulation patterns: (A) 25–75–25 Hz; (B) 30–75–30 Hz; (C) 35–75–35 Hz. (D) The histogram of the amplitude of transitory force decrease expressed in percent as a function of the fusion index for motor units of three types (FF, FR and S). Note that for calculations of mean values presented on the histogram all recorded tetanic contractions, i.e., also those without the transitory force decrease were included (zero value) and therefore the mean values are relatively low.



**Fig. 5.** The transitory force decrease is only visible in middle-fused tetanic contractions. Examples of four tetanic contractions at different stimulation patterns for one FR motor unit: (A) 25–75–25 Hz; (B) 30–75–30 Hz; (C) 35–75–35 Hz; (D) 40–75–40 Hz. Note that only in B and C was the transitory force decrease visible. The fusion index is indicated under the recordings.



**Fig. 6.** Weak influence of middle high-frequency stimulation on the amplitude of the transitory force decrease. Two superimposed contractions of the same FR motor unit at two low–high–low stimulation patterns evoked with the same low frequency of stimulation but different high frequencies (30–75–30 Hz—gray line; 30–150–30 Hz—black line). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

nonlinear process and the motoneuronal firing (stimulation) pattern may considerably modify the force production. Effects of sudden changes of stimulation frequency (including decrease) were studied on cat and human muscles. The cat muscles (medial gastrocnemius, lateral

gastrocnemius, soleus and quadriceps) were stimulated with the three-phase trials: 2 s at 20 Hz, 2 s at 40 Hz and finally 2 s at 20 Hz. Human muscles (triceps surae, tibialis anterior) were stimulated via the nerve for 2 s at 25 Hz, followed by 2 s at 100 Hz and then 2 s at 25 Hz. Under these conditions, all motor units were most likely co-activated, but no transitory decrease in force was observed (Frigon et al., 2011). In the present study performed on isolated motor units, the transitory force decrease was noted for approximately one-half of the motor units. These observations suggest that this phenomenon disappears as an effect of mechanical interaction between several co-active motor units. Further experiments testing the influence of co-contraction of other motor units in the same muscle on a studied transitory force decrease should confirm this suggestion. Moreover, it should be stressed that for different motor units, the stimulation frequency that was optimal to observe the strongest force decrease effect was different. Most likely because of the above observations, this phenomenon is not visible while the muscle is activated via nerve as the same stimulation pattern is applied to all motor units.

The transitory force decrease when a sudden change in stimulation frequency occurs was most frequently visible among FR motor units, but was also noted for some FF and S units. Therefore, the studied effect appeared not to be specific to a particular muscle fiber type. It suggests

that the mechanism of this phenomenon may not be related to a force production but to processes of force transmission within a muscle to a tendon. Muscle fibers of FR motor units are predominantly dispersed within the proximal compartment of medial gastrocnemius (De Ruiter et al., 1996; Gardiner et al., 1991). This compartment is relatively short; its length corresponds to 40% of the total muscle length (Taborowska et al., 2016). Therefore, the observed effect may be a response to a sudden decrease in the transmitted force whereby forces generated by motor units from the proximal compartment are transmitted to the Achilles tendon through a distal compartment (or its parts). This explanation is convergent with conclusions resulting from studies of interactions between motor units and summation of their forces. Forces recorded during co-activity of several motor units were smaller (Sandercock, 2000, 2009) or higher (Emonet-Dénand et al., 1987; Powers and Binder, 1991) than the algebraic sum of forces of these units measured during their individual activity. It was also found that with an increasing number of co-active motor units, the effects of summation of forces decreased (Drzymała-Celichowska et al., 2010). It was concluded that these differences between the recorded force and that estimated by algebraic summation of individual forces have a biomechanical background as they are dependent on topographical relations of the active motor units within the muscle and the pennated arrangement of muscle fibers (Cui et al., 2007; Sandercock, 2000; Zuurbier and Huijing, 1992). The medial gastrocnemius muscle is composed of two compartments, each containing a separate population of motor units. When the whole medial gastrocnemius muscle was stimulated and all muscle fibers of both proximal and distal compartments were co-activated, the recorded force was smaller in relation to the sum of the forces of the two compartments stimulated separately (Taborowska et al., 2016). Therefore, it is possible that the studied phenomenon of a transitory force decrease is present when contracting muscle fibers of the motor unit stretch the elastic collagen network in the muscle and a sudden decrease in the motor unit force occurs in response to a decrease in stimulation frequency that releases this passive part of the muscle. Because of a change in the pennation angle of released muscle fibers and/or elasticity of intramuscular collagen, the force from the motor unit is temporarily less efficiently transmitted to the tendon (Huijing and Jaspers, 2005; Huijing et al., 1998). This conclusion is additionally supported by an observation that within each motor unit type the studied phenomenon was more visible for weaker motor units (Table 1), which have a lower innervation ratio (Kanda and Hashizume, 1992) and their muscle fibers likely occupy a smaller territory in a muscle (Parmiggiani and Stein, 1981). On the other hand, in S motor units, which have the lowest force, the phenomenon was rare. The possible reason for this finding is that S motor units have three-times lower sensitivity to changes in instantaneous stimulation frequency (Grottel and Celichowski, 1999) and higher stiffness in relation to fast ones (Petit et al., 1990). In addition, the maximum rate of change in the force is the lowest for S motor units (Celichowski and Bichler, 1998).

Alternatively, given possible mechanisms of the observed phenomenon, one may suggest that intracellular processes should be taken into account as the muscle fiber force is related to the release of  $Ca^{2+}$  ions from the sarcoplasmic reticulum (Fitts, 2008). Cady et al. (1989) suggested that the brief tetanic muscle contractions in the fresh state cause a fast decrease in force. Changes in the  $Ca^{2+}$  level following muscle activity were reported by several authors (Cherednichenko et al., 2008; Westergaard and Allen, 1993). Chin and Allen (1996) observed that a reduction in submaximal stimulation frequency (from 70 Hz to 30 Hz) reduced intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by approximately 30%. These authors also claimed that the force decrease could be induced by changes in the cross-bridge kinetics because a fast decrease in the rate constant could cause disorders in  $Ca^{2+}$  transmission, in the attachment of myosin and actin, and the development of the high force state. In addition, a failure of the synaptic transmission (Fuglevand et al., 1993) is not a possible explanation of the transitory force decrease as this

force decrease was not accompanied by changes in the motor unit action potentials (Fig. 1).

The discovery of a new mechanism that temporarily reduces motor unit force opens the door to further questions. First, the mechanism of how the phenomenon influences force production in response to a progressive decrease in motoneuronal firing rate should be investigated. Second, it is important to observe the influence of the muscle length on the studied effect and to test the presence of this phenomenon in muscles of variable architecture. Third, several mechanisms of the studied force decrease were taken into account, however, additional experiments are necessary to explain the background of the phenomenon.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgements

The study was supported by the Polish National Science Center grant No. 2015/19/N/NZ7/01617.

### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jelekin.2019.02.008>.

### References

- Binder-Macleod, S.A., Clamann, H.P., 1989. Force output of cat motor units stimulated with trains of linearly varying frequency. *J. Neurophysiol.* 69 (1), 208–217.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., Zajac, F.E., 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol. Lond.* 234, 723–748.
- Burke, R.E., Rudomin, P., Zajac, F.E., 1976. The effect of activation history of tension production by individual muscle units. *Brain Res.* 109, 515–529.
- Cady, E.B., Elshove, H., Jones, D.A., Moll, A., 1989. The metabolic causes of slow relaxation in fatigued human skeletal muscle. *J. Physiol.* 418, 327–337.
- Celichowski, J., Bichler, E., 1998. The rate of changes in tension within fused tetani of single motor units in rat medial gastrocnemius muscle. *J. Physiol. Pharmacol.* 49, 595–603.
- Celichowski, J., Grottel, K., 1992. 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.* 130, 315–325.
- Celichowski, J., Krutki, P., Lochyński, D., Grottel, K., Mrówczyński, W., 2004. Tetanic depression in fast motor units of the cat gastrocnemius muscle. *J. Physiol. Pharmacol.* 55 (2), 291–303.
- Celichowski, J., 2000. Mechanism underlying the regulation of motor unit contraction in the skeletal muscle. *J. Physiol. Pharmacol.* 51 (1), 17–33.
- Cherednichenko, G., Ward, C.W., Feng, W., Cabrales, E., Michaelson, L., Samsó, M., Lopez, J.R., Allen, P.D., Pessah, I.N., 2008. Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes expressing malignant hyperthermia mutation R163C is attenuated by dantrolene. *Mol. Pharmacol.* 73, 1203–1212.
- Chin, E.R., Allen, D.G., 1996. The role of elevations in intracellular  $[Ca^{2+}]$  in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibers. *J. Physiol.* 491 (Pt 3), 813–824.
- Clamann, H.P., Schelhorn, T.B., 1988. Nonlinear force addition newly recruited motor units in the cat hindlimb. *Muscle Nerve.* 11, 1079–1089.
- Cui, L., Perreault, E.J., Sandercock, T.G., 2007. Motor unit composition has little effect on the short-range stiffness of feline medial gastrocnemius muscle. *J. Appl. Physiol.* 103 (3), 796–802.
- De Luca, C.J., Erim, Z., 1994. Common drive of motor units in regulation of muscle force. *Trends Neurosci.* 17, 299–305.
- De Luca, C.J., LeFever, R.S., McCue, M.P., Xenakis, A.P., 1982. Behaviour of human motor units in different muscles during linearly varying contractions. *J. Physiol.* 329, 113–128.
- De Ruiter, C.J., De Haan, A., Sargeant, A.J., 1996. Fast-twitch muscle units properties in different rat medial gastrocnemius muscle compartments. *J. Neurophysiol.* 75, 2243–2254.
- Drzymała-Celichowska, H., Krutki, P., Celichowski, J., 2010. Summation of motor unit forces in rat gastrocnemius muscle. *J. Electromyogr. Kinesiol.* 20, 599–607.
- Emonet-Dénand, F., Filippi, G.M., Laporte, Y., Petit, J., 1987. Summation of maximal tetanic tension developed by slow or fast motor units in cat peroneus longus muscle. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 305, 417–422.
- Fitts, R.H., 2008. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 104, 551–558.
- Frigon, A., Thompson, C.K., Johnson, M.D., Manuel, M., Hornby, G., Heckman, C.J.,



2011. Extra forces evoked during electrical stimulation of the muscle or its nerve are generated and modulated by a length-dependent intrinsic property of muscle in human and cats. *J. Neurosci.* 31 (15), 5579–5588.
- Fuglevand, A.J., Zackowski, K.M., Huey, K.A., Enoka, R.M., 1993. Impairment of neuromuscular propagation during human fatiguing contractions at submaximal forces. *J. Physiol.* 460, 549–572.
- Gardiner, P.F., Jamin, B.J., Corriveau, P., 1991. Rostrocaudal pattern of fiber-type changes in an overloaded rat ankle extensor. *J. Appl. Physiol.* 71, 558–564.
- Garland, S.J., Griffin, L., 1999. Motor units double discharges: statistical anomaly or functional entity? *Can. J. Appl. Physiol.* 24, 113–130.
- Grottel, K., Celichowski, J., 1990. Division of motor units in medial gastrocnemius muscle of the rat in the light of variability of their principal properties. *Acta Neurobiol. Exp.* 50, 571–588.
- Grottel, K., Celichowski, J., 1999. The influence of changes in the stimulation pattern on force and fusion in motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *Exp. Brain Res.* 127, 298–306.
- Henneman, E., Somjen, G., Carpenter, D.O., 1965. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 28, 560–580.
- Henneman, E., 1957. Relations between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126, 1345–1346.
- Huijting, P.A., Baan, G.C., Rebel, G.T., 1998. Non-myotendinous force transmission in rat extensor digitorum longus muscle. *J. Exp. Biol.* 201, 683–691.
- Huijting, P.A., Jaspers, R.T., 2005. Adaptation of muscle size of myofascial force transmission: a review and some new experimental results. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 15, 349–380.
- Kanda, K., Hashizume, K., 1992. Factors causing difference in force output among motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *J. Physiol.* 448, 677–695.
- Kernell, D., Eerbeek, O., Verhey, B.A., 1983. Motor unit categorization on basis of contractile properties: an experimental analysis of the composition of the cat's m. peroneus longus. *Exp. Brain Res.* 50, 211–219.
- MacIntosh, B.R., Jones, D., Devrome, A.N., Rassier, D.E., 2007. Prediction of summation in incompletely fused tetanic contractions of rat muscle. *J. Biomech.* 40, 1066–1072.
- Parmiggiani, F., Stein, R.B., 1981. Nonlinear summation of contraction in cat muscles. II. Later facilitation and stiffness changes. *J. Gen. Physiol.* 78, 295–311.
- Person, R.S., Kudina, L.P., 1972. Discharge frequency and discharge pattern of human motor units during voluntary contraction of muscle. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 471–483.
- Petit, J., Filippi, G.M., Emonet-Dénand, F., Hunt, C.C., Laporte, Y., 1990. Changes in muscle stiffness produced by motor units of different types in peroneus longus muscle of cat. *J. Neurophysiol.* 63, 190–197.
- Powers, R.K., Binder, M.D., 1991. Summation of motor units tension in tibialis posterior muscle of the cat under isometric and nonisometric conditions. *J. Neurophysiol.* 66, 1838–1846.
- Reinking, R.M., Stephens, J.A., Stuart, D.G., 1975. The motor units of cat medial gastrocnemius: problem of their categorisation on the basis of mechanical properties. *Exp. Brain Res.* 23 (3), 301–313.
- Sandercock, T.G., Heckmann, C.J., 1997. Doublet potentiation during eccentric and concentric contractions of cat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 82, 1219–1228.
- Sandercock, T.G., Maas, H., 2009. Force summation between muscles: are muscles independent actuators? *Med. Sci. Sports Exerc.* 41, 184–190.
- Sandercock, T.G., 2000. Nonlinear summation of force in cat soleus muscle results primarily from stretch of the common-elastic elements. *J. Appl. Physiol.* 89, 2206–2214.
- Taborowska, M., Bukowska, D., Drzymała-Celichowska, H., Mierzejewska-Krzyżowska, B., Celichowski, J., 2016. Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius. *Somatosen. Mot. Res.* 33 (3–4), 200–208.
- Westergaard, R.H., Allen, D.G., 1993. The contribution of  $[Ca^{2+}]$  to the slowing of relaxation in fatigued single fibers from mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* 468, 729–740.
- Zuurbier, C.J., Huijting, P.A., 1992. Influence of muscle geometry on shortening speed of fiber, aponeurosis and muscle. *J. Biomech.* 25, 1017–1025.
- Joanna Grzesiak** was born in Poland in 1989. She graduated the Faculty of Physiotherapy at Poznań University of Physical Education (2013). Now, she is Ph.D. student at the Department of Neurobiology at this university. Her research interest is focused on the nervous systems development, plasticity of neuromuscular system and mechanisms of motor control.
- Katarzyna Kryściak** was born in Poland in 1982. She graduated Faculty of Physiotherapy at Poznań University of Physical Education (2006). She received Ph.D. degree in medical biology from Mossakowski Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences in Warsaw (2012). Since 2009 she has worked at the Department of Neurobiology, Poznań University of Physical Education. Her main fields of interest are motor units and plasticity of the neuromuscular system.
- Hanna Drzymała-Celichowska** was born in Poland in 1980. She graduated A. Cieszkowski University of Agriculture in Poznań (2004), received Ph.D. degree in neurobiology from the Nencki Institute of Experimental Biology in Warsaw (2008) and habilitation in neurobiology (2017) from Jagiellonian University in Kraków. Since 2009 she has worked at the Department of Neurobiology and since 2012 at the Department of Biochemistry, Poznań University of Physical Education. Her major research interests are contractile properties of motor units and motor control, differences in rat hindlimb muscles between males and females.
- Jan Celichowski** was born in Poznań, Poland in 1960. He graduated A. Cieszkowski University of Agriculture (1983), a Ph.D. degree (1989) and the habilitation in neurophysiology from Nencki Institute of Experimental Biology in Warsaw (1996). Since 1997 he has been Professor of Neurophysiology, and since 2000 the Head of the Department of Neurobiology at Poznań University of Physical Education. His main fields of research are: motor units' contractile properties and action potentials, plasticity of the neuromuscular system, mechanomyography. He is a President of the Polish Neuroscience Society, member of FENS, IBRO, ECSS.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Biomechanical conditioning of the motor unit transitory force decrease following a reduction in stimulation rate

Joanna Rakoczy<sup>1\*</sup> , Katarzyna Kryściak<sup>1</sup>, Hanna Drzymała-Celichowska<sup>1</sup>, Rositsa Raikova<sup>2</sup> and Jan Celichowski<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** The biomechanical background of the transitory force decrease following a sudden reduction in the stimulation frequency under selected experimental conditions was studied on fast resistant motor units (MUs) of rat medial gastrocnemius in order to better understand the mechanisms of changes in force transmission.

**Methods:** Firstly, MUs were stimulated with three-phase trains of stimuli (low–high–low frequency pattern) to identify patterns when the strongest force decrease (3–36.5%) following the middle high frequency stimulation was observed. Then, in the second part of experiments, the MUs which presented the largest force decrease in the last low-frequency phase were alternatively tested under one of five conditions to analyse the influence of biomechanical factors of the force decrease: (1) determine the influence of muscle stretch on amplitude of the force decrease, (2) determine the numbers of interpulse intervals necessary to evoke the studied phenomenon, (3) study the influence of coactivation of other MUs on the studied force decrease, (4) test the presence of the transitory force decrease at progressive changes in stimulation frequency, (5) and perform mathematical analysis of changes in twitch-shape responses to individual stimuli within a tetanus phase with the studied force decrease.

**Results:** Results indicated that (1) the force decrease was highest when the muscle passive stretch was optimal for the MU twitch (100 mN); (2) the middle high-frequency burst of stimuli composed of at least several pulses was able to evoke the force decrease; (3) the force decrease was eliminated by a coactivation of 10% or more MUs in the examined muscle; (4) the transitory force decrease occurred also at the progressive decrease in stimulation frequency; and (5) a mathematical decomposition of contractions with the transitory force decrease into twitch-shape responses to individual stimuli revealed that the force decrease in question results from the decrease of twitch forces and a shortening in contraction time whereas further force restitution is related to the prolongation of relaxation.

**Conclusions:** High sensitivity to biomechanical conditioning indicates that the transitory force decrease is dependent on disturbances in the force transmission predominantly by collagen surrounding active muscle fibres.

**Keywords:** Motor unit, Unfused tetanus, Rate coding, Force regulation, Stimulation frequency

\* Correspondence: [joanna.rakoczy89@gmail.com](mailto:joanna.rakoczy89@gmail.com)

<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, 27/39 Królowej Jadwigi Street, 61-871 Poznań, Poland

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

The modulation of motor unit (MU) force during voluntary activity is attained by changes in the rate of motoneuronal firing [3, 21]. The unfused tetanic contractions are sums of twitch-shape responses to successive motoneuronal firings. The amplitude and time parameters of these responses are considerably variable [8]. Numerous studies concerning the sensitivity of MUs to the stimulation pattern indicated that force production is a nonlinear process. On the one hand shortening of a single interpulse interval evokes the catch effect [5, 10, 15], on the other hand its prolongation evokes the tetanic depression [7, 9]. Recently, a new physiological phenomenon of a transitory force decrease after a sudden reduction in the stimulation frequency was found [16]. The contractions of isolated MUs were evoked by three-phase trains of stimuli with a low–high–low frequency pattern, and the amplitude of the transitory force decrease during the last phase exceeded even 30% of the force level, which was reached at the end of the second low frequency stimulation. The mechanisms of this effect have not been explained as yet. A previous study suggested that the transitory force decrease probably has a biomechanical background, involving processes of the force transmission by collagen within the muscle, because the phenomenon was found for only one-half of studied MUs, most frequently fast-resistant (FR) ones [16]. These units in the studied medial gastrocnemius muscle were found to be distributed predominantly within the proximal compartment [27], corresponding to only 40% of the muscle length [26], which indicates that their force is transmitted by collagen structures in the distal compartment.

Therefore, in the present study, we investigated the importance of biomechanical factors for the transitory force decrease, analysing effects of muscle passive stretching and parallel tetanic contractions of other MUs in the same muscle. These two factors are expected to influence force transmission by intramuscular collagen. In addition, we tested whether a shortening of only one interpulse interval within the train at a stable frequency (the shortest possible middle high-frequency phase) is able to evoke the studied force decrease after a force increase and how a progressively increasing number of pulses at a high rate influence the described effect. Then, the presence of a transitory force decrease at progressive changes in the stimulation frequency was tested in the contractions evoked by trains of stimuli with sinusoidal changes in frequency because a sudden switch from higher to lower frequency in the motoneuronal firing rate is not observed during voluntary activity whereas trains of stimuli with sinusoidal changes in frequency are similar to the normal behaviour of motoneurons. Finally, to more deeply understand the studied

phenomenon, a mathematical decomposition of tetanic contraction with the studied transitory force decrease into a train of twitch-shape responses to successive stimuli was performed. The decomposition method is based on modeling of individual twitch forces attributed to each stimulus by progressive subtraction of successive twitch-shape curves from the unfused tetanus curve in order to follow the changes of the twitch properties leading to the studied force decrease [23].

Better understanding of the studied phenomenon could improve actual knowledge of the role of rate coding in motor control. Especially, we hypothesized that the phenomenon influence the force at progressively decreasing stimulation frequency and a confirmation of this hypothesis is important to better understand mechanisms shaping muscle force when motoneurons are decreasing firing rate, a process observed usually in human experiments when force of contraction is decreasing before the end of muscle activity.

## Methods

### Ethical Approval

All procedures were made to minimize the suffering of the examined animals and were approved by the Local Ethics Committee for Experiments on Animals (number of Permission: 2/2015). Additionally, various principles of laboratory animal care (Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences, the Polish Law on the Protection of Animals, and European Union regulations) were followed. Experiments were performed on Wistar rats, which were bought from Wielkopolska Center for Advanced Technologies in Poznan, owner of an animal house designed to perform experiments in conditions of GLP (Good Laboratory Practice).

### Surgery and experimental procedures

Experiments were performed on 10 female Wistar rats (4–5 months) weighing  $256.4 \pm 35.1$  g. Before the experiments, the rats were kept in cages equipped with running wheels to ensure a moderate level of their activity, in an animal room with a 12:12 light/dark cycle and controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ). All rats had unrestricted access to standard laboratory food and tap water throughout the study period.

During experiments, the animals were anesthetized (sodium pentobarbital; initial dose of 60 mg/kg, *i.p.* supplemented approximately with doses of 10 mg/kg/h). The depth of anaesthesia was controlled by the observation of pinna and withdrawal reflexes. After the experiments the animals were euthanized (sodium pentobarbital, 180 mg/kg).

The studied muscle and sciatic nerve were separated from surrounding tissues, while other hind limb muscles

were denervated. Laminectomy was performed over the L2–L6 vertebrae. The ventral roots were cut close to the spinal cord. The animals were immobilized with steel clamps placed on the tibia, the sacral bone, and the L1 vertebra. The hind limb under study was immersed in a chamber filled with paraffin oil (temperature-regulated automatically at  $37 \pm 1$  °C) and the spinal cord was similarly covered with the oil. The muscle was connected through the Achilles tendon to a force transducer (deflection of 100  $\mu$ m per 100 mN), which measured both the isometric force and the muscle passive tension.

The functional isolation of single MUs was achieved by splitting the L5 or L4 ventral roots into thin filaments electrically stimulated with rectangular pulses (amplitude up to 0.5 V, duration of 0.1 ms). The MU action potentials were recorded with bipolar silver wire electrodes inserted into the muscle. The ‘all-or-none’ appearance of twitch and MU potentials at increasing amplitudes of stimuli indicated the activity of single MU. All data were recorded on a computer disc using a 12-bit analogue-to-digital converter (sampling rates of 1 kHz and 10 kHz for force and action potentials, respectively).

In this study, 122 MUs of rat medial gastrocnemius were investigated. Seventy of them (51 FR, 10 FF, and 9 S MUs) revealed the transitory force decrease of at least a 3% amplitude and were included into the experimental procedures described below. MUs were classified into fast (F) and slow (S) based on the presence of sag in 40 Hz contraction [4]. However, due to artefacts in the force recordings, weak studied effect, low force, and high noise-to-signal ratio (mainly in the S MUs) as well as considerable instability in force due to the fatigue (mainly in the FF MUs), only 46 FR units were analysed.

### The experimental protocol

All MUs tested during our experiments were initially stimulated according to following steps:

- I. MUs classification and transitory force decrease appearance:
  1. Five pulses at 1 Hz (twitch forces and action potentials were recorded and averaged)
  2. A 500-ms train of pulses at 40 Hz (the ‘sag’ in the unfused tetanus was controlled)
  3. A 300-ms train of pulses at 150 Hz (the maximum force was determined)
  4. For FR MUs, a set of recordings of tetanic contractions evoked with a three-phase train of pulses at changing frequencies in a low–high–low frequency pattern as follows: a 500-ms train of stimuli at low frequency, a 300-ms train at high frequency, and a 500-ms train at the same low frequency as the initial train, respectively. The low frequencies were 15, 20, 25, 30, 35, and

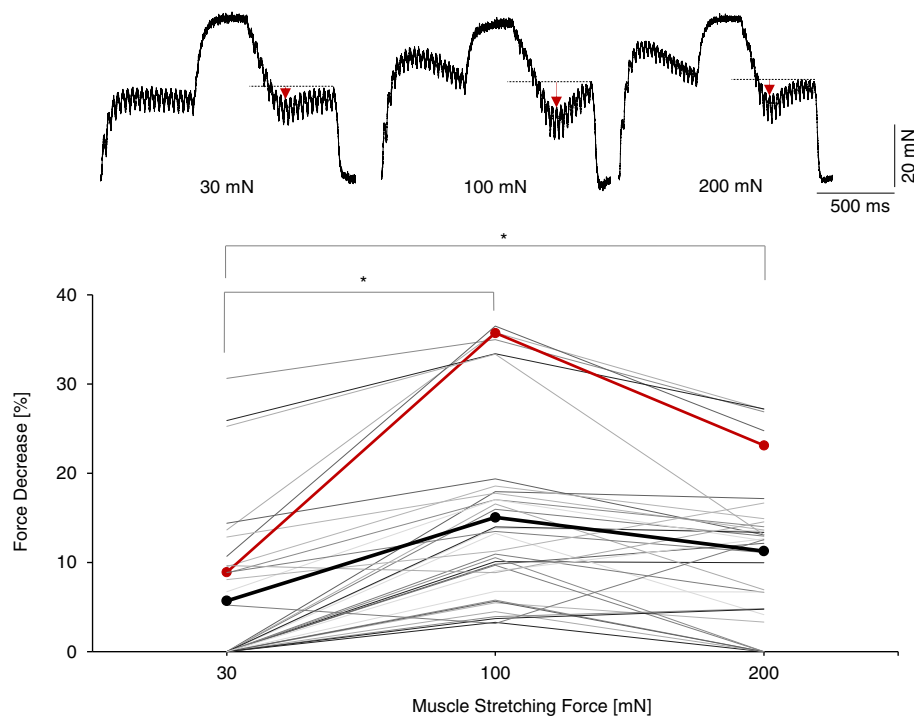
40 Hz, while the high frequencies were 75, 90 and 150 Hz, and all possible combinations of low and high frequencies were tested, i.e., the protocol included 18 trials delivered according to increasing stimulation frequency.

Ten-second intervals between each part of the stimulation protocol were applied.

- II. Biomechanical conditioning of the transitory force decrease:

The transitory force decrease in the third phase of the contraction was measured in relation to the force at the end of tetanus. When its amplitude exceeded 3% and the MUs were stable in force, these MUs were selected for the following additional steps of the experiment. For each of them, one of the protocols described below was applied (based on the pattern from step 4., which has evoked the strongest transitory force decrease):

1. Recordings of one to five tetanic contractions (low frequencies ranging from 25 to 35 Hz, combined with high 75 and/or 90 Hz; 35 stimulations) were repeated at the stable muscle passive stretches of 30 mN, then 100 mN, and finally 200 mN, set at least 30 s before recordings and kept constant throughout a series of recordings (6 MUs) (Fig. 1).
2. A set of tetanic contractions with 1, 2, 4, 6 and 18 short interpulse intervals (11.1 ms) within the high-frequency phase of stimulation (i.e. in the middle part of trains of stimuli) was recorded. The number of stimuli within the low-frequency phases (35 or 40 Hz) was constant (8 MUs) (Fig. 2).
3. The selected recording was repeated during a parallel maximum tetanic contraction of a single MU or group of MUs and separately as a control before and after; additionally, this accompanying tetanic contraction was also recorded separately. The maximum tetanic contraction was evoked by 150 Hz stimulation delivered for 2000 ms (channel 1 of the stimulator), whereas the three-phase contraction (channel 2) was delayed by 250 ms and ended at 250 ms before the end of the tetanic contraction. The maximal force of coactivated MUs ranged from 20 mN up to 1000 mN (13 MUs) (Fig. 3).
4. Recordings of the force beginning at a constant phase of stimulation followed by sinusoidal changes in the stimulation frequency were done (rate of changes was 2–4 Hz, three sines; the range of changes of stimulation frequency was 7 Hz and was matched individually for each MU to evoke unfused tetanic contractions). For a comparison, instead of



**Fig. 1** The influence of the muscle passive stretch on the amplitude of the transitory force decrease. Upper recordings: a set of sample recordings of the tetanic contractions of fast resistant motor unit stimulated with a 30–75–30 Hz pattern in a muscle stretched up to the passive forces of 30, 100, and 200 mN. The horizontal interrupted lines indicate the reference force at the end of tetanus used to calculate the amplitude of the force decrease. The red vertical arrows indicate the amplitude of the force decrease. Lower graph: amplitude of the force decrease obtained for the muscle passive stretch values of 30, 100, and 200 mN. Data for each set of recordings are connected by a line; the bold red line refers to motor unit illustrated upper. The figure presents combined data for 6 fast resistant motor units for 9 applied stimulation patterns. Note that, at 30 mN for some recordings, the transitory force decrease was not present. The black line connects the mean values at three tested levels of muscle passive stretch; level of significance of differences is indicated above. Significance of differences between groups is represented by \* ( $p < 0.01$ )

sinusoidal changes, sudden switches between high and low stimulation frequencies were also applied (9 MUs) (Fig. 4).

- For 10 MUs, the decomposition of their unfused tetanus with the transitory force decrease (recordings within step 4 of the stimulation protocol) into twitch-shape responses to individual stimuli was completed according to a method described previously [23]. Changes in twitch parameters for successive decomposed responses were analysed (Fig. 5).

At the end of recordings for each MU, the fatigue test was performed (trains of 14 stimuli at 40 Hz repeated each second for 3 min) [4].

#### The analysed parameters

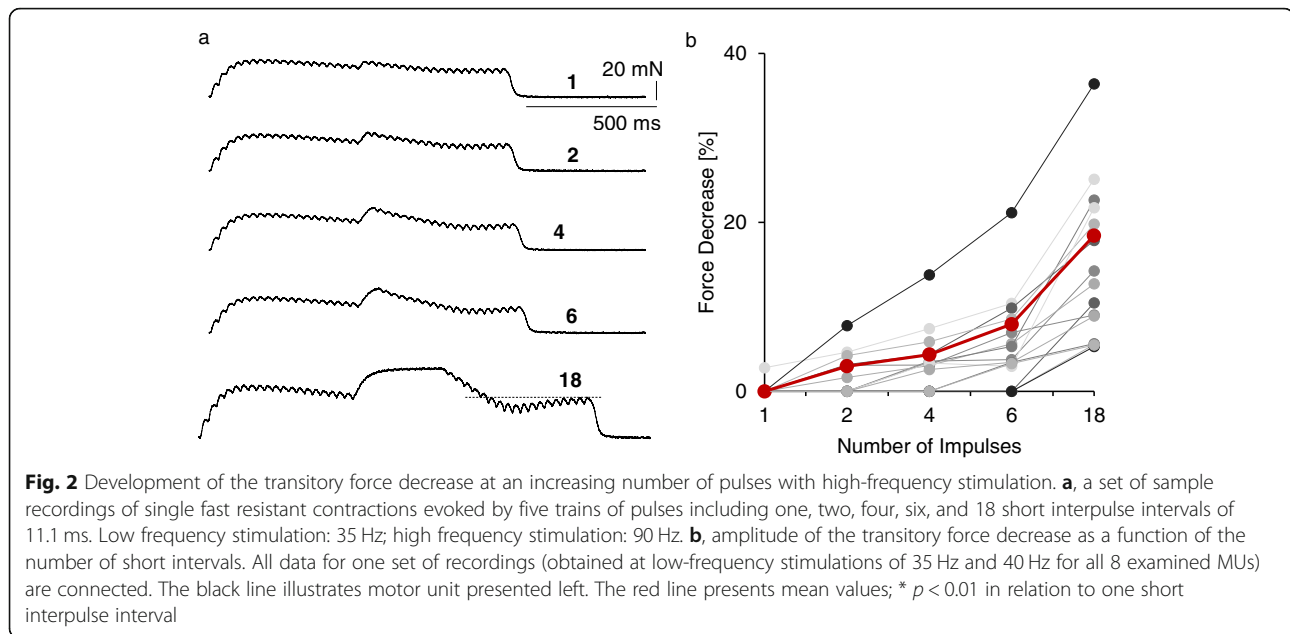
For the single twitches, the peak force, contraction time (from the beginning of a twitch up to the peak), and half-relaxation time (from the peak up to a

moment when the force decreased to 50% of peak value) were obtained. The studied units were accepted as F basing on sag in 40-Hz unfused tetanus. The fatigue index (the force generated by MU after 2 min of the fatigue test to the initial force) was calculated; for all selected MUs, the index exceeded 0.5. All data are presented as mean  $\pm$  SD.

#### Results

##### The influence of passive muscle stretch on the amplitude of transitory force decrease

Among the three applied values of the muscle stretch (30, 100, and 200 mN), the highest effect of the transitory force decrease was observed at 100 mN ( $15.1 \pm 10.5\%$ ), whereas, for 200 mN and 30 mN, lower amplitudes of the force decrease were noted ( $11.3 \pm 8.2\%$  and  $5.7 \pm 9.3\%$ , respectively) (Fig. 1). Although for all selected patterns the transitory force decrease was visible at 100 mN, at 30 mN for 21 and at 200 mN for 6 out of 35 used patterns, respectively, it was abolished. The



significance of differences between the compared groups (30 mN, 100 mN, 200 mN) was tested using a one-way ANOVA, post-hoc Fisher test.

#### Dependence of the transitory force decrease on the number of pulses at high frequency

The effects of shortening of 1, 2, 4, 6, and 18 interpulse intervals tested for eight FR MUs at 35 and 40 Hz revealed that the studied force decrease was dependent on a number of high-frequency stimuli (Fig. 2). For all recordings, a shortening of only one interpulse interval did not evoke the transitory force decrease, but, with an increasing number of high-frequency stimuli, said force reduction progressively developed. The significance of differences between the compared groups (1, 2, 4, 6, 18 impulses) was tested using a one-way ANOVA, post-hoc Fisher test.

#### The influence of the coactivity of other MUs on the transitory force decrease

The influence of a parallel maximum tetanic contraction of individual MUs or groups of units generating a large spectrum of forces (20.4–987.4 mN) on the transitory force decrease in selected MUs appeared to be dependent on this force level (Fig. 3). The separate recording with the transitory force decrease was compared to that obtained by removing the force of accompanying tetanic contraction from the common force recording (Fig. 3a vs. 3b and 3d vs. 3e), and the activity of this MU was compared to the force recorded without accompanying activity; subsequently, the differences in amplitude of the transitory force decrease in these two

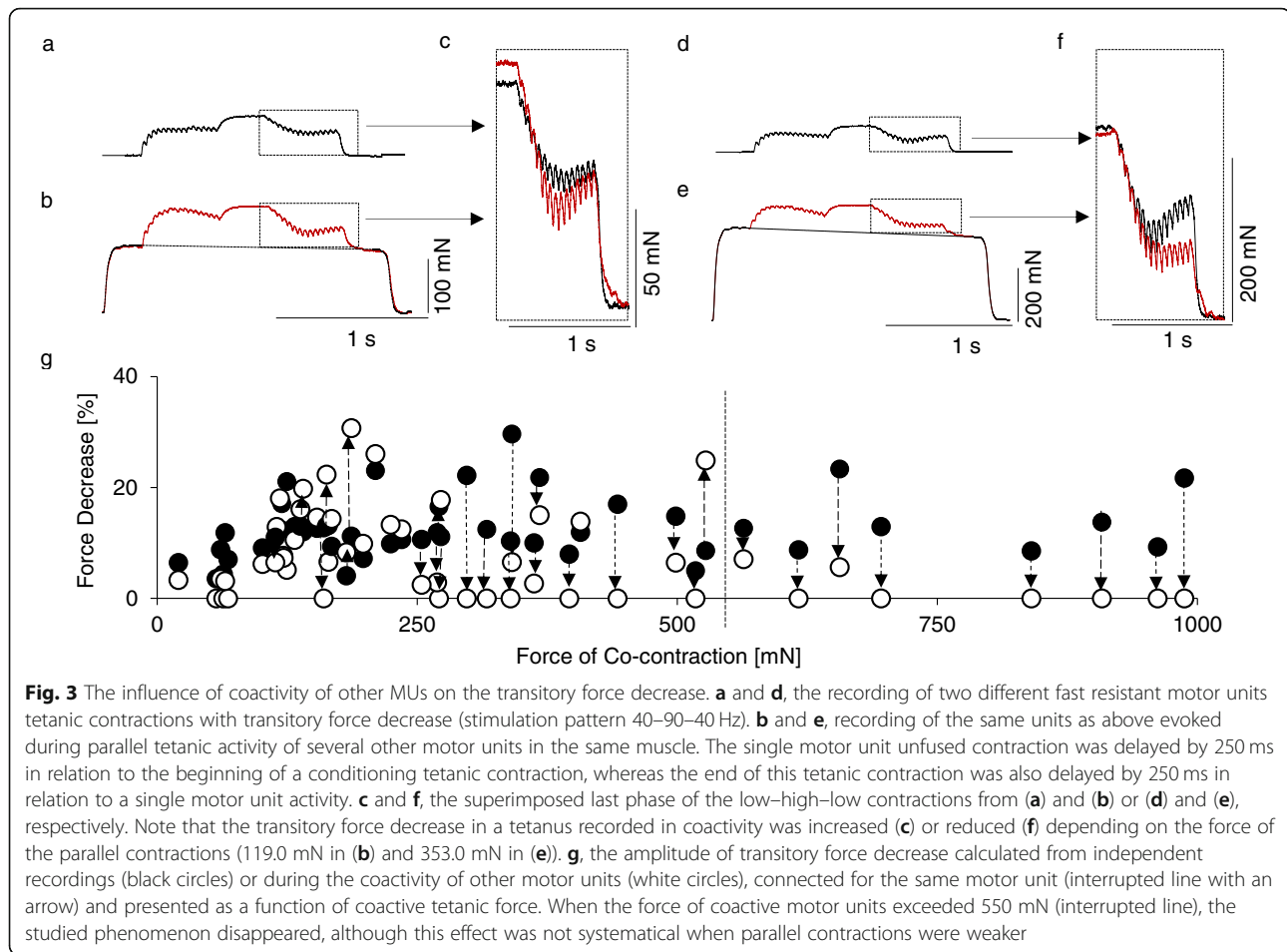
recordings were calculated. For each of 13 MUs, several combinations with accompanying groups of units were recorded (yielding a total of 53 sets of recordings). The amplitude of the transitory force decrease was considerably reduced or abolished when the force of coactive MU(s) exceeded 550 mN (Fig. 3g, arrows directed down). At lower forces, the studied phenomenon in some cases even increased (Fig. 3g, arrows directed up).

#### The transitory force decrease during sinusoidal changes in the stimulation frequency

When the presence of a transitory force decrease was tested at progressive, sinusoidal changes in the frequency of stimulation, the force decreased to the lowest level at a low stimulation frequency within the first cycle (the mean difference in comparison to the following cycles amounted to 23.9%) (Fig. 4b). In separately recorded tetanic contractions, when the stimulation suddenly switched several times between high and low frequencies instead of presenting sinusoidal changes, the transitory force decrease was also visible at the first reduction of the frequency (Fig. 4a).

#### Decomposition of the tetanic contraction with the transitory force decrease into responses to successive stimuli

To explain changes in responses to individual stimuli leading to the transitory force decrease, the decomposition of selected contractions into a series of twitch-shape responses was performed. The contraction for decomposition was obtained as a difference between the three-phase (low–high–low) and the two-phase (low–



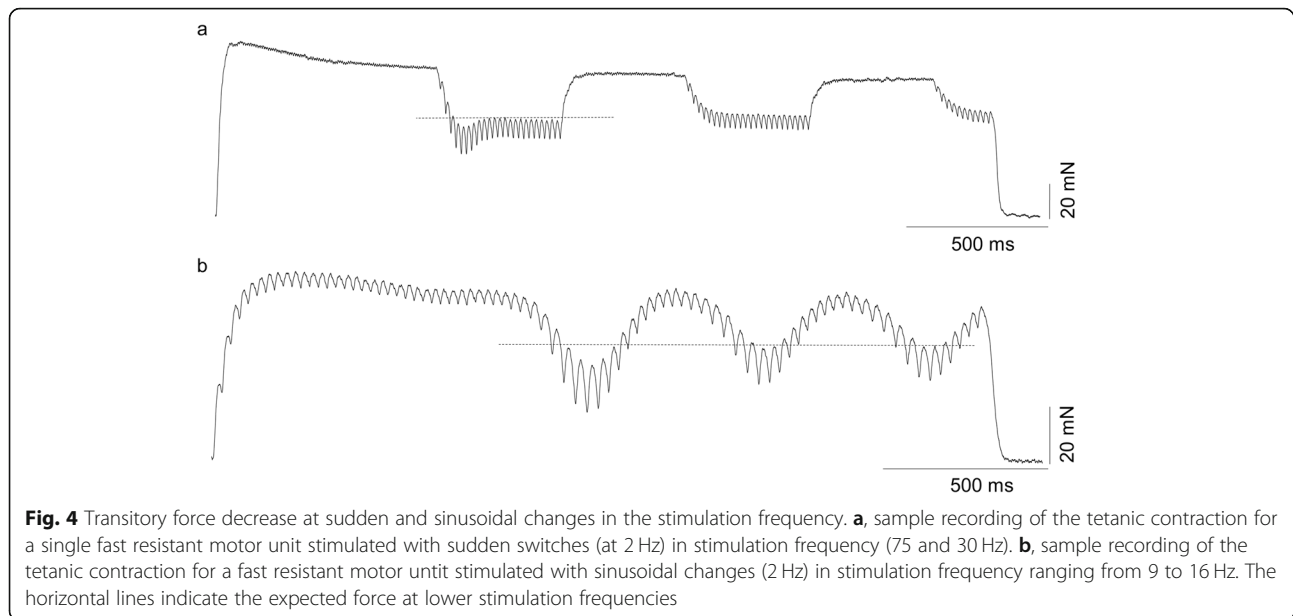
high) recordings (Fig. 5a–c). The amplitude of the transitory force decrease ranged between 5.3 and 36.4%. The analysis revealed that the force decrease resulted from a decrease of amplitudes of the decomposed twitches and a shortening in the contraction time, whereas the following force increase was an effect of a prolongation in relaxation (Fig. 5d–h).

### Discussion

The presented results indicate that a recently reported transitory force decrease [16] is not related to a decrease in the force generated by muscle fibres but rather to a deterioration in the transmission of the force to the tendon. The structures involved in this process are likely intramuscular collagen, although it is possible that other muscle proteins as titin, the muscle fiber elastic structural protein [18] or even muscle fibres surrounding active MUs might be taken into consideration.

The transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency appeared to be dependent on several biomechanical conditions, specifically muscle passive tension (Fig. 1) and coactivation of

other MUs in this muscle (Fig. 3). It is known that MU force is dependent on muscle stretches [24] as well as may be modified by the coactivity of other MUs [13]. The MUs of rat medial gastrocnemius generate the highest twitch force at a muscle passive tension of 100 mN [6], whereas the twitch duration expands with an increase of muscle passive tension. The transitory force decrease was evidently the strongest at 100 mN, which is optimal for the twitch force (Fig. 1). This observation may be related to stretch-modified properties of the collagen surrounding the contracting MU(s) or neighbouring, nonactive muscle fibres. Contracting muscle fibres pull the surrounding intramuscular collagen against the external load. Meijer [19] reported that a common system of the myofibril connections of two neighbouring muscle fibres to the same collagen in the basal lamina had an impact in force generation. The decrease in stimulation frequency evokes a sudden reduction in contractile force. The force reduction develops faster than an adaptation of passive parts of a muscle to reduced transmitted force, leading to the transitory force decrease. At a high (200 mN) or low (30 mN) applied muscle



stretch, the passive structural proteins of muscle fibres have modified elastic properties, leading to a decrease in the amplitude of the studied phenomenon when compared to the optimal muscle stretch (100 mN) when the twitch force in isometric recording is the highest [6].

The transitory force decrease may be reduced by coactivation of other MUs. This observation explains why this phenomenon was not observed in similar experiments (also based on low–high–low frequency of stimulation) on human muscles stimulated via the nerve [14]. The present results show that, when the force of coactive MUs exceeded 550 mN, the transitory force decrease disappeared. In the studied muscle, the mean value of MU tetanus force amounted to 144 mN, whereas the force of the muscle stimulated via nerve was 5.25 N; the muscle consists of 52 MUs [11]. Therefore, the contraction of approximately 10 to 15% of the MUs (4–5 MUs in a studied muscle) is sufficient to abolish the studied phenomenon. It is possible that territories of two to three MUs do not overlap substantially. With increasing number of coactive MUs and overlapping of their territories, the likelihood that their muscle fibres are neighbours and transmit force by the same parts of collagen is also increased.

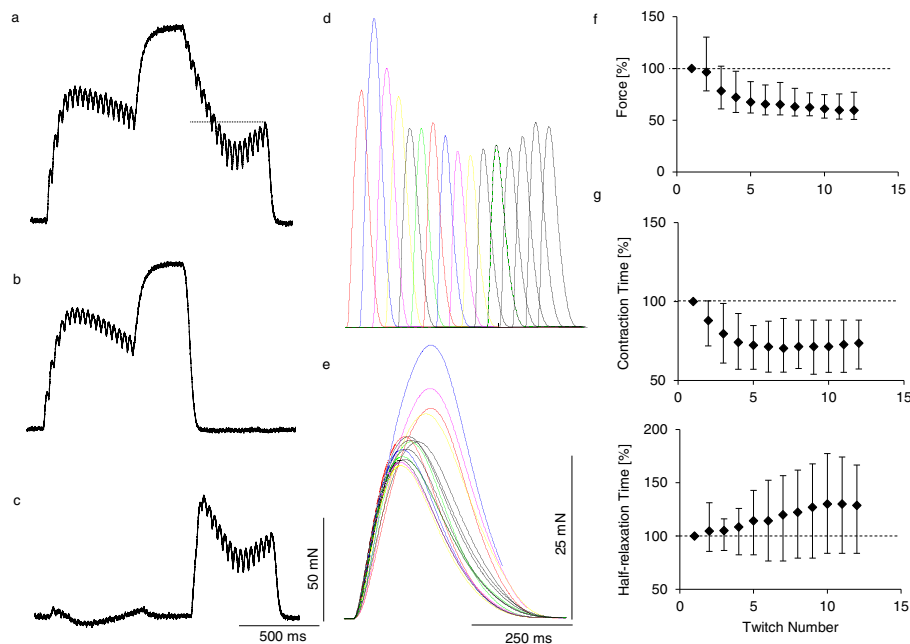
The MU force is sensitive to a pattern of activating stimuli; even a change in the first interpulse interval modifies the force production (see [Background](#)). Therefore, we tested whether the shortening of one interpulse interval is a sufficient enough action to evoke a transitory force decrease (Fig. 2). However, this phenomenon appeared after a longer series of pulses at a high frequency. This observation contrasts

previously described effects of an initial doublet of stimuli or prolonged initial interpulse interval. The catch effect as well as tetanic depression probably depends on intracellular changes of the calcium level [1, 2, 17]. The transitory force decrease needs longer trains of high-frequency stimuli, which supports disturbances in the force transmission as a possible mechanism. This suggestion is supported by the observation that transitory force decrease occurs most frequently in FR MUs, distributed in the proximal compartment of the medial gastrocnemius [12] and covering only 40% of the muscle length [26], indicating that force must be transmitted to the tendon by long intramuscular collagen structures.

The decomposition of tetanic contractions revealed that the transitory force decrease is related predominantly to a shortening of the contraction time and a decrease in the force of decomposed twitches, followed by an increase of the half-relaxation time responsible for the final force recovery. It is worth emphasising that changes in relaxation efficiently influence the production of force during MU activity [25].

Sudden decreases or increases in the motoneuronal firing rate are not observed in voluntary activity. However, the sinusoidal changes in stimulation frequency resemble modulations in motoneuronal firing described in prior papers [20, 22]. The present results revealed that, at sinusoidal changes in stimulation frequency, the transitory force decrease influences the MU force. Therefore, the described phenomenon potentially influences the force at decreasing firings of motoneurons in vivo, in humans, leading to a force





**Fig. 5** Decomposition of the tetanic contraction with the force decrease into twitch-shape responses to successive stimuli. **a**, a single fast resistant motor unit force recording with a low–high–low stimulation frequency pattern. **b**, recording of the same motor unit at a low–high frequency stimulation. **c**, mathematical difference between **(a)** and **(b)**, taken for the decomposition. **d**, a train of twitch-shape responses to successive stimuli resulting from the mathematical decomposition of recording **(c)**. **e**, all decomposed twitches presented superimposed with the stimulus time accepted as 0 for all twitches. The contractile parameters of successive twitches for 10 studied motor units (mean  $\pm$  SD) presented in relation to the first decomposed twitch (100%): **f** – twitch force, **g** – contraction time and **(h)** – half-relaxation time (mean values and standard deviations). Due to some differences between individual motor units regarding the number of stimuli at the last low-frequency phase (minimum 12), the data are presented for 12 twitches

reduction occurring faster than expected, assuming a linear transmission of firing rate into the force.

## Conclusions

The transitory force decrease is a biomechanical effect most probably resulting from disturbances in force transmission from muscle fibres to tendons by adjacent collagen structures or possibly also other elastic muscle proteins. The phenomenon occurs not only during a sudden switch from high- to low-stimulation frequencies but also at progressive decreases in stimulation frequency, and therefore potentially influences the muscle force at decreasing firing rates of motoneurons during voluntary activity.

## Abbreviations

F: Fast; FF: Fast fatigable; FR: Fast resistant; MU(s): Motor unit(s); S: Slow

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

All authors have read and have approved the content of the manuscript. Conceptualization: JC, JR. Data Curation: JR, KK, HDC, RR, JC. Formal Analysis: JC, JR, KK, RR. Funding Acquisition: JR (Grzesiak) - National Science Center (grant No. 2015/19/N/NZ7/01617). Investigation: JR, KK, HDC, JC. Methodology: JC, JR, HDC. Project Administration: JC, JR. Resources: JC, JR, KK. Validation: JC, JR.

Visualization JR, JC. Writing – Original Draft Preparation: JC, JR. Writing – Review & Editing: JR, KK, HDC, JC.

## Funding

The study was supported by the Polish National Science Center (grant no. 2015/19/N/NZ7/01617). NCN is a government agency, supervised by the Ministry of Science and Higher Education, set up in 2011 to support basic research in Poland.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Ethics approval and consent to participate

All procedures were made to minimize the suffering of the examined animals and were approved by the Local Ethics Committee for Experiments on Animals (number of Permission: 2/2015). Additionally, various principles of laboratory animal care (Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences, the Polish Law on the Protection of Animals, and European Union regulations) were followed.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, 27/39 Królowej Jadwigi Street, 61-871 Poznań, Poland. <sup>2</sup>Institute of Biophysics and Biomedical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria.

Received: 19 March 2020 Accepted: 3 September 2020

Published online: 29 September 2020

## References

- Allen DG, Lamb DG, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008;88(1):287–332.
- Allen DG, Westerblad H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. *J Physiol.* 2001;536(3):657–65.
- Boe SG, Stashuk DW, Brown WF, Doherty TJ. Decomposition-based quantitative electromyography: effect of force on MU potentials and MU number estimates. *Muscle Nerve.* 2005;31(3):365–73.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FR. Physiological types and histochemical profiles in MUs of the cat gastrocnemius. *J Physiol.* 1973; 234(3):723–48.
- Burke RE, Rudomin P, Zajac FE. The effect of activation history on tension production by individual muscle units. *Brain Res.* 1976;109(3):515–29.
- Celichowski J, Grottel K. The dependence of the twitch course of medial gastrocnemius muscle of the rat and its MUs on stretching of the muscle. *Arch Ital Biol.* 1992;130(4):315–25.
- Celichowski J, Krutki P, Łochyński D, Grottel K, Mrówczyński W. Tetanic depression in fast MUs of the cat gastrocnemius. *J Physiol Pharmacol.* 2004; 55(2):291–303.
- Celichowski J, Raikova R, Adajov H, Krutki P. Dynamic changes of twitchlike responses to successive stimuli studied by decomposition of MU contractions in rat medial gastrocnemius. *J Neurophysiol.* 2014;112(12): 3116–24.
- Celichowski J. Tetanic depression: a phenomenon influencing the production of tension in fast twitch MUs in rat medial gastrocnemius. *Acta Neurobiol Exp.* 2001;61:119–23.
- Celichowski J, Grottel K, Bichler E. The area under the record of contractile tension: estimation of work performed by a contracting MU. *Acta Neurobiol Exp.* 1998;58:165–8.
- Celichowski J, Drzymała-Celichowska H. The number of MUs in the medial gastrocnemius muscle of male and female rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58(4):821–8.
- De Ruyter CJ, De Haan A, Sargeant AJ. Fast-twitch muscle unit properties in different rat medial gastrocnemius muscle compartments. *J Neurophysiol.* 1996;75(6):2243–54.
- Drzymała-Celichowska H, Celichowski J. Summation of MU forces in rat medial gastrocnemius muscle. *J Electromyogr Kinesiol.* 2010;20:599–607.
- Frigon A, Thompson CK, Johnson MD, Manuel M, Hornby G, Heckman CJ. Extra forces evoked during electrical stimulation of the muscle or its nerve are generated and modulated by a length-dependent intrinsic property of muscle in human and cats. *J Neurosci.* 2011;31(15):5579–88.
- Gorassini M, Eken T, Bennet DJ, Kiehn O, Hultborn H. Activity of hindlimb MUs during locomotion in the conscious rat. *J Neurophysiol.* 2000;83(4): 2002–11.
- Grzesiak J, Kryściak K, Drzymała-Celichowska H, Celichowski J. Transitory force decrease following a sudden reduction in stimulation frequency in MUs of rat medial gastrocnemius. *J Electromyogr Kinesiol.* 2019;46:14–20.
- Łochyński D, Celichowski J. Tetanic depression and catch-like effect in fast motor units of the rat medial gastrocnemius at linearly increasing and decreasing stimulation frequencies. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009;30(3–4): 153–60.
- Herzog JA, Leonard TR, Jinha A, Herzog W. Are titin properties reflected in single myofibrils? *J Biomech.* 2012;45(11):1893–99.
- Meijer HJM. Aspects of epimuscular myofascial force transmission: a physiological, pathological and comparative-zoological approach. Amsterdam; 2007. thesis.
- Moritz CT, Barry BK, Pascoe MA, Enoka RM. Discharge rate variability influences the variation in force fluctuations across the working range of a hand muscle. *J Neurophysiol.* 2005;93(5):2449–59.
- Nakamura H, Yoshida M, Kotani M, Akazawa K, Moritani T. The application of independent component analysis to the multi-channel surface electromyographic signals for separation of MU action potential trains: part I—measuring techniques. *J Electromyogr Kinesiol.* 2004;14(4):423–32.
- Person RS, Kudina LP. Discharge frequency and discharge pattern of human MUs during voluntary contraction of muscle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32(2):471–83.
- Raikova R, Celichowski J, Pogrzebna M, Aladjov H, Krutki P. Modeling of summation of individual twitches into unfused tetanus for various types of rat MUs. *J Electromyogr Kinesiol.* 2007;17(2):121–30.
- Rassier DE, MacIntosh BR, Herzog W. Length dependence of active force production in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1999;86(5):1445–57.
- Smith IC, Ali J, Power GA, Herzog W. The sag response in human muscle contraction. *Eur. J Appl Physiol.* 2018;118(5):1063–77.
- Taborowska M, Bukowska D, Drzymała-Celichowska H, Mierzejewska-Krzyżowska B, Celichowski J. Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius. *Somatosens Mot Res.* 2016;33(3–4):200–8.
- Vanden Noven S, Gardiner PF, Seburn KL. Motoneurons innervating two regions of rat medial gastrocnemius muscle with differing contractile and histochemical properties. *Acta Anat.* 1994;150:282–93.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

