



Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

**mgr Magdalena Piotr**

**Cechy morfometryczne oraz rozłożenie wrzecion mięśniowych  
w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki  
samców i samic szczurów Wistar**

Rozprawa doktorska

Promotor:  
prof. dr hab. Jan Celichowski

Poznań 2025



## SPIS TREŚCI

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| SPIS TREŚCI .....                                             | 3  |
| DANE O KANDYDATCE .....                                       | 4  |
| STRESZCZENIE .....                                            | 5  |
| ABSTRACT .....                                                | 6  |
| 1. WSTĘP .....                                                | 7  |
| 2. CEL BADAŃ I HIPOTEZY .....                                 | 13 |
| 3. CYKL PUBLIKACJI.....                                       | 14 |
| 4. MATERIAŁ I METODY.....                                     | 15 |
| 5. WYNIKI .....                                               | 17 |
| 6. DYSKUSJA .....                                             | 19 |
| 7. WNIOSKI .....                                              | 24 |
| 8. PIŚMIENNICTWO .....                                        | 25 |
| PODZIĘKOWANIA .....                                           | 30 |
| PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ – INFORMACJE DODATKOWE ..... | 31 |
| ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA.....                                | 32 |
| ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE.....                                  | 43 |

## **DANE O KANDYDATCE**

Data uzyskania tytułu magistra: 4.07.2008 r.

Nazwa jednostki organizacyjnej, w której nadany został tytuł: Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Kandydatka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Aktualne miejsce pracy: Zakład Neurobiologii, Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.

Zajmowane stanowisko: od 1.10.2014 r. – starszy specjalista badawczo-techniczny.



## STRESZCZENIE

Mięśnie szkieletowe wykazują szereg zależnych od płci różnic dotyczących masy, liczby i proporcji włókien mięśniowych różnych typów, liczby i proporcji jednostek ruchowych różnych typów oraz ich cech skurczu, a także liczby i rozmiarów motoneuronów unerwiających mięśnie. Celem badań było poznanie dymorfizmu płciowego w odniesieniu do liczby, struktury, gęstości i rozłożenia wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki szczura. Mięśnie samców ( $n = 10$ ) i samic ( $n = 10$ ) pocięto poprzecznie na seryjne skrawki (o grubości 5–20  $\mu\text{m}$ ), na których identyfikowano wrzeciona mięśniowe. Nie stwierdzono istotnej różnicy ( $p > 0,05$ ) w liczbie wrzecion mięśniowych samców ( $14,45 \pm 2,77$ ) i samic ( $15,00 \pm 3,13$ ). Masa mięśni była o 38,89% większa u samców (1,08 g vs. 0,66 g u samic), przez co gęstość tych receptorów była istotnie wyższa ( $p < 0,01$ ) u samic (jedno wrzeciono na 51,14 mg masy mięśnia w porównaniu z jednym wrzecionem na 79,91 mg masy mięśnia u samców). Nie stwierdzono znaczących różnic między właściwościami morfometrycznymi włókien mięśniowych śródwrzecionowych i wrzecion mięśniowych ( $p > 0,05$ ):  $5,16 \pm 2,43 \mu\text{m}$  i  $5,37 \pm 2,27 \mu\text{m}$  w odniesieniu do średnicy włókien mięśniowych odpowiednio dla samców i samic;  $5,57 \pm 2,20$  i  $5,60 \pm 2,16$  w odniesieniu do liczby włókien mięśniowych śródwrzecionowych odpowiednio dla samców i samic;  $25,85 \pm 10,04 \mu\text{m}$  i  $25,30 \pm 9,96 \mu\text{m}$  w odniesieniu do krótszej średnicy wrzecion mięśniowych odpowiednio dla samców i samic; oraz  $48,99 \pm 20,73 \mu\text{m}$  i  $43,97 \pm 16,96 \mu\text{m}$  w odniesieniu do dłuższej średnicy wrzecion mięśniowych odpowiednio dla samców i samic. Ponadto, gdy porównano długości wrzecion mięśniowych samców i samic, średnie długości nie różniły się istotnie ( $3,3 \pm 1,47 \text{ mm}$  u samców i  $3,26 \pm 1,32 \text{ mm}$  u samic). Dane te sugerują, że różnice międzypłciowe w odniesieniu do wrzecion mięśniowych mięśnia przyśrodkowego brzuchatego łydki szczura są ograniczone do ich gęstości, co odbiega od wcześniejszych danych opisujących różnice w średnicy włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych. Dla badanego mięśnia dodatkowo przeanalizowano przestrzeny rozkład wrzecion mięśniowych i po raz pierwszy zwizualizowano rozkład wrzecion w mięśniu za pomocą trójwymiarowego modelu mięśnia. W celu analizy rozkładu wrzecion mięsień podzielono na 10 sektorów wzdłuż mięśnia. Stwierdzono, że wrzeciona mięśniowe były rozmieszczone głównie w proksymalnie-przyśrodkowych sektorach mięśnia. Nie odnotowano związanych z płcią różnic w rozmieszczeniu badanych receptorów. Pojedynczy sektor zawierał średnio 2,71 receptora dla zwierząt obu płci. Wyniki przeprowadzonych badań poszerzają podstawową wiedzę w zakresie różnic między mięśniami szkieletowymi u osobników płci męskiej i żeńskiej.

## ABSTRACT

Skeletal muscles reveal numerous sex-related differences concerning their mass, number and proportion of muscle fibers of various types, number and proportions of three types of motor units as well as their contractile properties, and finally number and size of motoneurons. This study aimed to investigate the sexual dimorphism of muscle spindles in rat medial gastrocnemius muscle. The muscles of male ( $n = 10$ ) and female ( $n = 10$ ) rats were cut transversely into 5–20  $\mu\text{m}$  thick serial sections and the number, density, and morphometric properties of the muscle spindles were determined. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the number of muscle spindles in male ( $14.45 \pm 2.77$ ) and female ( $15.00 \pm 3.13$ ) rats. Muscle mass was 38.89% higher in males (1.08 g vs. 0.66 g in females), making the density of these receptors significantly higher ( $p < 0.01$ ) in females (approximately one spindle per 51.14 mg muscle mass vs. one per 79.91 mg in males). There were no significant differences between the morphometric properties of intrafusal muscle fibers or muscle spindles in male and female rats ( $p > 0.05$ ):  $5.16 \pm 2.43 \mu\text{m}$  and  $5.37 \pm 2.27 \mu\text{m}$  for male and female intrafusal muscle fiber diameter, respectively;  $5.57 \pm 2.20$  and  $5.60 \pm 2.16$  for male and female intrafusal muscle fiber number, respectively;  $25.85 \pm 10.04 \mu\text{m}$  and  $25.30 \pm 9.96 \mu\text{m}$  for male and female shorter muscle spindle diameter, respectively; and  $48.99 \pm 20.73 \mu\text{m}$  and  $43.97 \pm 16.96 \mu\text{m}$  for male and female longer muscle spindle diameter, respectively. Moreover, the calculated lengths of muscle spindles in male and female rats were not different statistically ( $3.30 \pm 1.47 \text{ mm}$  for male and  $3.26 \pm 1.32 \text{ mm}$  for female rats). These findings suggest that sexual dimorphism in the muscle spindles of rat medial gastrocnemius is limited to their density, which contrasts previous observations reporting differences in extrafusal muscle fibers diameters. Next, the spatial distribution of the medial gastrocnemius muscle spindles of 10 male and 10 female muscles was analysed under the light microscope, and for the first time, visualised using a 3D model of the muscle. Serial cross-sections of the medial gastrocnemius muscles were separated into 10 divisions along the proximo-distal axis. The muscle spindles of the rat medial gastrocnemius were predominantly distributed on the proximo-medial divisions of the muscle. There were no sex-related differences in the distribution of the studied receptors. A single division contained an average of 2.71 receptors for animals of both sexes. Therefore, the present results enlarge basic knowledge concerning differences between skeletal muscles in male and female individuals.

# 1. WSTĘP

## *Różnice w uwarunkowaniach motorycznych mężczyzn i kobiet*

Zawody sportowe mężczyzn i kobiet z reguły są organizowane osobno, co powiązane jest z różnicami dotyczącymi ich uwarunkowań do uprawiania różnych dyscyplin sportowych. Szacunkowo różnica w prędkości biegu między mężczyznami i kobietami osiągnięta w tradycyjnych sportach wytrzymałościowych (np. maratonie) utrzymuje się na poziomie ~10%, podczas gdy różnice w zawodach ultrawytrzymałościowych odnotowano na poziomie 4% pomimo wyraźnie mniejszej liczby uczestniczek w zawodach sportowych tego typu. Ponadto kobiety na ogół osiągają lepsze wyniki niż mężczyźni w pływaniu na duże odległości (Tiller i in. 2021). Chociaż mężczyźni i kobiety nie różnią się pod względem ekonomii biegu ani wytrzymałości (tj. procentu utrzymywanej zdolności przenoszenia tlenu), to biomechanika biegu jest odmienna dla zawodników obu płci. Kobiety mają większą rotację ruchu w osi strzałkowej w stawach biodrowym i kolanowym w porównaniu z mężczyznami, co można częściowo wyjaśnić przez różnice anatomiczne, m.in. szerszą miednicę, większy kąt kości udowo-piszczelowej, krótszą długość kończyn dolnych w stosunku do całkowitego wzrostu kobiet. W porównaniu z mężczyznami kobiety wykazują również większą proporcjonalną powierzchnię włókien typu I (tlenowych, wolnokurczliwych), częściej wykorzystują kwasy tłuszczowe i zachowują węglowodany podczas długotrwałych ćwiczeń, wykazują bardziej równomierną strategię tempa i mniejsze zmęczenie po biegach wytrzymałościowych. Wymienione różnice dają kobietom przewagę w wynikach ultrawytrzymałościowych, ale inne czynniki (np. niższa zdolność przenoszenia tlenu, wyższy procent tkanki tłuszczowej) równoważą te potencjalne zalety, co sprawia, że kobiety osiągające lepsze wyniki niż mężczyźni startujący w tych samych zawodach są wyjątkiem (Besson i in. 2022). Inna analiza uwarunkowań płciowych wykazała ochronną rolę testosteronu przed uszkodzeniem mięśni i ich zmęczeniem, co może wpływać na większą odporność na zmęczenie u mężczyzn niż u kobiet (Collado-Boira i in. 2021). Ponadto krążący we krwi testosteron jest obecnie uważany za najważniejszy czynnik odpowiadający za przewagę mężczyzn w wynikach sportowych, wynoszącą od 10% do nawet 20% w porównaniu z rezultatami kobiet. Odnotowano też, że gdy zawodniczki z endogennym poziomem testosteronu w męskim zakresie (tj. 10–20 razy wyższym niż przeciętnie u kobiet) konkurowały z kobietami z normalnym poziomem androgenów, te pierwsze osiągały znacznie lepsze rezultaty (Hirschberg 2020). Z kolei podczas badania EMG (elektrofizjologicznego badania czynności mięśni) mężczyźni wykazywali większą aktywację mięśni podczas koncentrycznej fazy skoku w testach skoku z odbicia (w przeciwną stronę) i następującego potem lądowania. U kobiet natomiast odnotowano wyższy współczynnik koaktywacji zginaczy podszwowych podczas fazy odpychania przy testowanych skokach. Analiza EMG wykazała także większą aktywność EMG w mięśniach piszczelowych przednim i prostym uda u mężczyzn, a dodatkowo, również u mężczyzn, stwierdzono wyższą koaktywację zginaczy podszwowych podczas lądowania (Márquez i in. 2017). Mimo to zmęczenie obwodowe, na co wskazują wybrane parametry skurczu mięśni, nie różniło się między płciami zarówno po wysiłku izometrycznym, jak i izotonicznym. Podobne proporcje typów włókien mięśniowych zginaczy podszwowych dla badanych osób obu płci i większa heterogeniczność typów włókien mogą wyjaśniać, dlaczego

różnice między płciami w zmęczeniu mięśni, choć powszechne w innych grupach mięśni (np. w aktywności prostowników kolan), nie zostały wykazane w przypadku zginaczy podeszwowych (Ha i in. 2022).

W porównaniu z liczbą analiz dotyczących sportów wytrzymałościowych istnieje bardzo niewiele danych na temat różnic między płciami w sportach wymagających precyzji ruchu i kontroli położenia ciała, takich jak łucznictwo, strzelanie precyzyjne, biathlon, a ponadto dane te nie są jednoznaczne. Najnowsze doniesienia wskazują, że w badaniach polegających na analizie wpływu widzenia na przestrzenną i czasową kontrolę niezależnych ruchów palców dominującej i niedominującej ręki kobiety wykazywały większą niezależną kontrolę palców kończyny górnej w porównaniu z mężczyznami (Johansson i in. 2021). Co więcej, zbadano powiązanie postrzegania całego ciała z kontrolą postawy i wpływem płci uczestników na te cechy. U kobiet schemat kontroli postawy ciała był statystycznie istotnie lepiej powiązany ze wskaźnikiem utrzymania równowagi i sterowania ciałem w otwartej pętli, a ponadto z takimi czynnikami jak kondycja sensoryczna, wiek i niektóre cechy antropometryczne (Schulleri i in. 2022). Ponadto w badaniu wpływu m.in. płci na precyzję wykonywania ruchów kończyny górnej w płaszczyznach czołowej, poprzecznej i strzałkowej przy zastosowaniu modelu liniowego testu precyzji ruchów wykazano większą dokładność ruchów ręki u kobiet (Liutsko i in. 2020). W innych badaniach udowodniono, że istnieją różnice między płciami w zakresie propriocepcji i funkcji mechanicznych kończyn dolnych. Z badań indeksu propriocepcji stawów skokowego i kolanowego wynika, że mężczyźni cechuje wyższy wskaźnik wycucia pozycji tych stawów w trakcie ruchu w porównaniu z kobietami (Hu i in. 2020). Z kolei w zawodach biathlonowych przeanalizowano względny czas na trasie, wyniki w strzelaniu (tj. czas kary), czas strzelania i czas na strzelnicy w stosunku do całkowitego czasu wyścigu u mężczyzn i u kobiet i zaobserwowano, że mężczyźni osiągalili większą szybkość i precyzję ruchu w porównaniu z kobietami startującymi osobno w tej konkurencji. Mężczyźni strzelali średnio o 15 sekund szybciej niż kobiety, a łączny czas wykonywania przez nich kary był o 18 sekund krótszy niż u kobiet (Luchsinger i in. 2018). Co należy podkreślić, najistotniejszymi receptorami czucia głębokiego, których czynność jest podstawą kontroli przestrzennego położenia ciała, są wrzeciona mięśniowe znajdujące się we wszystkich mięśniach szkieletowych, u człowieka w liczbie od kilkunastu do kilkuset (Prochazka 2021).

Podsumowując, przedstawione powyżej dane wskazują na osiąganie lepszych rezultatów przez mężczyzn w sportach szybkościowych i wytrzymałościowych, natomiast nie-liczne badania sugerują, że w sportach wymagających precyzji ruchu kobiety powinny uzyskiwać lepsze wyniki, choć dostępna jest bardzo niewielka liczba danych mogących wyjaśnić rolę wrzecion mięśniowych w potencjalnych różnicach między płciami w takich dyscyplinach jak np. łucznictwo czy strzelectwo.

### *Lokalizacja i funkcja mięśnia brzuchatego łydki*

Układ ruchu, odpowiedzialny za uprawianie sportów, tworzą kości i mięśnie szkieletowe poprzecznie prążkowane. Do mięśni kończyny tylnej należy m.in. mięsień brzuchaty łydki. Odpowiada on głównie za wykonywanie szybkich ruchów, takich jak bieganie czy skoki. W tego rodzaju aktywności jego funkcją jest zginanie podeszwowe stopy w stawie skokowym i zginanie kończyny tylnej w stawie kolanowym. Mięsień brzuchaty łydki składa się z dwóch części: głowy przyśrodkowej (*m. gastrocnemius medialis*) i głowy bocznej (*m. gastrocnemius lateralis*). Mięsień przyśrodkowy ma przyczep początkowy (proksymalny) umieszczony w powierzchni tylnej kłykcia przyśrodkowego kości udowej, natomiast przyczep końcowy (dystalny) znajduje się na kości piętowej i tworzony jest przez

ścięgno piętowe (Achillesa) wspólnie z mięśniem płaszczkowatym. Mięsień brzuchaty przyśrodkowy unerwiają aksony nerwu piszczelowego mające u człowieka początek w segmentach rdzenia kręgowego L4–S2, biegnące poprzez splot krzyżowy, a następnie w nerwie kulszowym (Fitz-Ritson 1982; Popesko i in. 2011).

Mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki ze względu na lokalizację i budowę jest jednym z najlepiej poznanych w doświadczeniach elektrofizjologicznych mięśni szkieletowych. Jest to zarazem modelowy mięsień wykorzystywany w badaniach przeprowadzonych na szczurach Wistar obu płci w Zakładzie Neurobiologii AWF Poznań. W odniesieniu do tego mięśnia wykazano znaczące różnice międzypłciowe m.in. w masie ciała, masie mięśni, liczbie i średnicy włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych oraz unerwienia jednostek ruchowych (Drzymała-Celichowska i Celichowski 2020; Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2011; Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2014). Wykazano, że samce szczurów Wistar mają o 87% większą masę ciała i o 53% większą masę tych mięśni niż samice. Ponadto u samców liczba włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych była o 27% większa niż u samic, a średnica tych włókien była większa o około 14%. W analizach biorących pod uwagę liczbę jednostek ruchowych i liczbę włókien mięśniowych wykazano, że jeden  $\alpha$ -motoneuron unerwia o około 35% więcej włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych u samców niż u samic (Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2011). Dodatkowo średnica ciała  $\gamma$ -motoneuronów jest o 9%, a  $\alpha$ -motoneuronów o 6% większa u samców niż u samic (Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2014). Natomiast zaobserwowano, że średnia liczba  $\gamma$ -motoneuronów (unerwiających włókna mięśniowe śródwrzecionowe) w jądrze ruchowym mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki szczura jest zbliżona u samców i samic, co mogło wskazywać na podobną liczbę wrzecion mięśniowych w tym mięśniu u szczurów obu płci i zwróciło uwagę na potrzebę zbadania tego.

### *Wrzeciona mięśniowe, ich struktura i rola*

Za odbiór i przewodzenie bodźców w układzie nerwowym odpowiadają wyspecjalizowane receptory. Ich liczba i gęstość są różne w poszczególnych częściach ciała człowieka. W przypadku receptorów skórnych, odpowiedzialnych za percepcję bodźców zewnętrznych (np. dotyk, ucisk, temperatura), największa ich gęstość występuje na języku, wargach, a także opuszkach palców rąk i na stopach, co ma odzwierciedlenie w organizacji somatotopowej kory czuciowej mózgu człowieka i wiąże się z większą precyzją czucia (np. w przypadku dotyku warunkuje to czytanie tekstu napisanego alfabetem Braille’a opuszkami palców) w tych częściach ciała (Górski [red.] 2006). Te obserwacje zwracają uwagę na znaczenie gęstości receptorów.

Inna grupa receptorów odpowiada za tzw. czucie głębokie, które zazwyczaj nie jest uświadamiane. Do receptorów, które decydują m.in. o równowadze czy kontroli położenia i ruchu poszczególnych części ciała w przestrzeni, należą: narząd równowagi w uchu wewnętrznym, wrzeciona mięśniowe, narządy ścięgna Golgiego i receptory stawowe. Wrzeciona mięśniowe znajdują się w głębi mięśni szkieletowych, otoczone kolagenową torebką zwaną kapsułą, i położone są pomiędzy pęczkami włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych (ekstrafuzalnych). Składają się z 2–10 włókien śródwrzecionowych (intrafuzalnych), których środkowe części nie kurczą się, gdyż nie posiadają prążkowania, są natomiast wypełnione jądrami komórkowymi; w tej części znajdują się także zakończenia włókien czuciowych, które odpowiadają za właściwą funkcję receptora. Dwa włókna śródwrzecionowe są dłuższe (tzw. włókna worka jądrowego), a ponadto we wrzecionie występuje zmienna liczba krótszych włókien (tzw. włókien łańcucha jądrowego). Włókna te oprócz unerwienia aferentnego (czuciowego) posiadają także unerwienie



eferentne (motoryczne) przez  $\gamma$ -motoneurony, które regulują czynność wrzecion mięśniowych, a mianowicie pobudzają zakończenia czuciowe lub zwiększają odpowiedź na rozciąganie mięśnia (Fitz-Ritson 1982; McComas i in. 2018). Wrzeciona mięśniowe w środkowej części mają dwa rodzaje zakończeń czuciowych, tworzonych przez włókna aferentne typu Ia (zakończenie pierwotne) i II (zakończenie wtórne). Zakończenia te przekazują informacje czuciowe z wrzecion mięśniowych do rdzenia kręgowego w odpowiedzi na rozciąganie mięśnia i/lub skurcz włókien mięśniowych śródwrzecionowych. Zakończenia wtórne rejestrują i przenoszą informacje o aktualnej długości mięśnia, a włókna typu Ia reagują najsilniej podczas rozciągania wrzecion mięśniowych (mięśni). Oba rodzaje zakończeń czuciowych zlokalizowane są na niekurczącym się fragmencie włókien mięśniowych, a zatem ich pobudzanie następuje podczas skurczu włókien śródwrzecionowych, prowadzącym do napinania ich centralnej części. Zasadniczo skurcz włókien śródwrzecionowych jest równoczesny ze skurczem włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych (czyli podczas aktywności mięśnia). Z tych powodów wrzeciona mięśniowe są receptorami czucia głębokiego mocno pobudzanymi podczas aktywności mięśni, w czasie której ich wrażliwość na rozciąganie mięśni jest zwiększona, i odpowiadają za lokalizację oraz kontrolę rozmieszczenia poszczególnych części ciała w przestrzeni. Dodatkowo wrzeciona mięśniowe wspierają utrzymanie równowagi i kontrolują stan napięcia oraz koordynację działania różnych antagonistycznych mięśni kończyny tylnej i w istotny sposób zwiększają siłę skurczu mięśni, ponieważ ich włókna czuciowe Ia monosynaptycznie pobudzają motoneurony homonimiczne i synergistyczne (Dimitriou 2022; Grottel i Krutki 1996; Proske 1997; Proske i Gandevia 2009).

W wielu mięśniach tworzących układ ruchu człowieka zagęszczenie wrzecion mięśniowych jest zróżnicowane. Szacuje się, że w różnych mięśniach szkieletowych człowieka znajduje się średnio około 30 000 wrzecion mięśniowych, a ich gęstość wynosi od 1 do 100 na 1 g masy mięśnia (Prochazka 2021). Największa liczba wrzecion mięśniowych znajduje się w mięśniach o największej masie, np. dwugłowym ramienia i piszczelowym przednim (odpowiednio: średnio 320 i 284 wrzeciona w jednym mięśniu). Z kolei dla mięśnia przyśrodkowego brzuchatego łydki jest ona o około 1/3 niższa i wynosi średnio 80 wrzecion. Ponadto dla tego mięśnia szacuje się występowanie średnio 580 aksonów motoneuronów w nerwie i 1 000 000 włókien mięśniowych przypadających na jeden mięsień (Buchthal i Schmalbruch 1980).

Różnice międzypłciowe w liczbie i gęstości wrzecion mięśniowych u człowieka nie zostały do tej pory zbadane. W jedynym dostępnym doniesieniu szacuje się liczbę wrzecion mięśniowych u mężczyzn na około 20% większą niż u kobiet (w mięśniach gałki ocznej człowieka), co może zwiększać zdolności mężczyzn do efektywniejszej kontroli wzrokowo-proprioceptywnej wykonywanych ruchów (Łukas i in. 1994).

#### *Badania wrzecion mięśniowych na modelach zwierzęcych*

Badania na modelach zwierzęcych dotyczące różnic między płciami w zakresie cech morfometrycznych, liczby i gęstości wrzecion nie były prowadzone. Dostępne dane są fragmentaryczne. Gęstość wrzecion mięśniowych dotychczas zbadano jedynie dla całego mięśnia brzuchatego łydki (obie głowy mięśnia). Al-Mallak (2006) ustalił, że gęstość wrzecion w tym mięśniu wynosi 5,78 wrzeciona na 1 g masy mięśnia u dorosłych szczurów. Ponadto w publikacji przeglądowej Banks (2006) podał, że gęstość wrzecion wynosi 40,3 wrzeciona na 1 g masy ciała szczura, 6,5 wrzeciona na 1 g masy ciała kota oraz 0,40 wrzeciona na 1 g masy ciała człowieka, jednak wymienieni badacze nie analizowali różnic międzypłciowych.

Badania prowadzone na modelach zwierzęcych uzupełniają istotną część wiedzy odnoszącej się do roli propriocepcji. Niedawno opublikowane podstawowe badania poszerzyły istotnie zrozumienie roli wrzecion mięśniowych w lokomocji i jej wybranych zaburzeniach. Opisano molekularny mechanizm aktywacji wrzecion mięśniowych, a ponadto wykazano rolę wrzecion w możliwości modulacji kontroli ruchu i wyjaśniono jej złożoność (Santuz i Akay 2023). Z kolei w innych badaniach, dotyczących realizacji protokołu treningu składającego się z dwóch prób pokonania labiryntu wodnego Morrisa przez szczury szczepu Wistar, odnotowano, że samice nauczyły się wykonywać to zadanie już czwartego dnia, podczas gdy samce potrzebowały więcej treningu i wykonały zadanie dopiero szóstego dnia. Wyniki te wskazują na szybszy proces konsolidacji bodźców proprioceptywnych w testach na orientację w grupie samic niż w grupie samców (Gutiérrez-Menéndez i in. 2023). W zbliżonych badaniach wykazano wydłużony czas przebywania samic szczurów rasy Long-Evans w basenie peryferyjnym podczas testu, co – jak sugerowano – może wynikać z wpływu hormonów żeńskich na orientację przestrzenną (Devan i in. 2016). Do tej pory różnice między płciami w wydajności poznawczo-przestrzennej i konsolidacji pamięci w przebiegu wykonywania ruchów nie zostały ostatecznie potwierdzone. Niemniej wyniki badań wskazują, że propriocepcja jest jednym z czynników istotnie wpływających na uzdolnienia motoryczne.

#### *Braki w zakresie wiedzy o wrzecionach mięśniowych*

Podstawowe cechy morfologiczne wrzecion mięśniowych zostały dotychczas przeanalizowane dla kilku gatunków ssaków, różnych typów mięśni, które pełnią odmienne funkcje, oraz u osobników w różnym wieku (Banks 2006; Bredman i in. 1991; Kim i in. 2007). Taka różnorodność danych pozwala wprawdzie porównać niektóre cechy wrzecion mięśniowych, jednak dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że większość badań dotyczących właściwości morfometrycznych tych receptorów prowadzona była na osobnikach płci męskiej. Ponadto za różnice w zakresie właściwości morfometrycznych wrzecion mięśniowych mogą odpowiadać hormony męskie wpływające na masę mięśni u samców (English i Schwartz 2002; Gegenhuber i in. 2022), jednak w literaturze całkowicie nieznany pozostaje potencjalny wpływ hormonów na włókna śródwrzecionowe i morfometrię wrzecion mięśniowych. W żadnych badaniach nie podjęto próby wyjaśnienia, czy cechy morfometryczne wrzecion mięśniowych różnią się u osobników obu płci.

W przypadku opublikowanych wyników badań mających na celu opis rozmieszczenia wrzecion mięśniowych (zazwyczaj w osi proksymalno-dystalnej mięśni szkieletowych) dane wielokrotnie obejmują także samice, ale brakuje porównań między płciami. Przykładowo dla kilku mięśni kończyny tylnej myszy dokonano analiz rozmieszczenia wrzecion mięśniowych, wykazując przewagę receptorów rozmieszczonych w części proksymalnej i środkowej czterech mięśni: brzuchatego łydki, piszczelowego przedniego, płaszczkowatego oraz prostownika długiego palców, u samic myszy (Lian i in. 2022). Podobnych obserwacji dokonano w innych badaniach, również analizując mięsień płaszczkowaty u samców myszy (Zeller-Plumhoff i in. 2017).

Potrzeba badań morfometrycznych wrzecion mięśniowych wynika także z badań opisujących powiązane z płcią zróżnicowanie morfologiczne mięśni szkieletowych. Ustalono, że włókna mięśniowe zewnątrzwrzecionowe mięśni płaszczkowatego i brzuchatego łydki u człowieka są dłuższe u mężczyzn niż u kobiet (Chow i in. 2000). Nie wiadomo jednak, czy taka obserwacja ma również związek z długością wrzecion mięśniowych mierzoną jako długość ich włókien śródwrzecionowych. Z danych literaturowych wynika, że średnia długość wrzecion w mięśniach gryzoni jest mocno zmienna i waha się od 0,14 mm do

5,40 mm (Eldred i in. 1998; Kierner i in. 1999; May i in. 2018), natomiast dla większości mięśni człowieka i kota wynosi od 8 mm do 10 mm (Boyd 1962), jednak brakuje porównań długości tych receptorów w mięśniach samców i samic dla jakichkolwiek gatunków ssaków.



## 2. CEL BADAŃ I HIPOTEZY

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, czy istnieje morfologiczne i anatomiczne zróżnicowanie najważniejszych receptorów mięśniowych czucia głębokiego, czyli wrzecion mięśniowych, ze względu na płeć. W tym celu dokonano analizy liczby, gęstości i właściwości morfometrycznych wrzecion mięśniowych, w tym długości tych receptorów w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki, oraz wykonano analizy liczby i rozmiarów włókien śródwrzecionowych. Wyniki analiz dodatkowo przedstawiono na modelu 3D zrekonstruowanym ze skrawków mięśni, ilustrującym w nowatorski sposób przestrzenne rozmieszczenie wrzecion mięśniowych w osi proksymalno-dystalnej mięśnia. Badania te przeprowadzone zostały na szczurach szczepu Wistar. Uzyskane rezultaty stanowią uzupełnienie brakujących danych dotyczących różnic międzypłciowych w odniesieniu do wyżej wymienionych cech wrzecion mięśniowych w mięśniach szkieletowych, a ponadto poszerzają aktualny stan wiedzy z zakresu neuroanatomii tych receptorów.

Przyjęto następujące hipotezy badawcze:

1. Liczba wrzecion mięśniowych w mięśniach zwierząt obu płci jest zbliżona.
2. Gęstość wrzecion mięśniowych jest wyższa w mięśniach samic.
3. Wrzeciona mięśniowe samców mają większe rozmiary.
4. Wrzeciona mięśniowe są rozłożone przede wszystkim w proksymalnej części mięśnia u zwierząt obu płci.

### 3. CYKL PUBLIKACJI

Wyniki badań wrzecion mięśniowych, jakie zostały przeprowadzone w ramach grantu NCN 2018/31/B/NZ7/01028 *Różnice płciowe głównych elementów odruchu na rozciąganie: motoneuronów oraz wrzecion mięśniowych*, opublikowano w dwóch artykułach. Publikacje te tworzą cykl podsumowany w niniejszym autoreferacie pod wspólnym tytułem: ***Cechy morfometryczne oraz rozłożenie wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki samców i samic szczurów Wistar.***

1. Gartych M., Jackowiak H., Bukowska D., Celichowski J. (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Front. Neuroanat.* 15, 734555. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.734555>  
punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 3,543
2. Piotr M., Skieresz-Szewczyk K., Jackowiak H., Celichowski J. (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *J. Anat.* 243 (4), 658–663. <https://doi.org/10.1111/joa.13895>  
punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 2,921

Łącznie: punktacja MEiN: 240; Impact Factor: 6,464

## 4. MATERIAŁ I METODY

Eksperymenty przeprowadzono na 3-miesięcznych szczurach szczepu Wistar (sześciu samcach i sześciu samicach). Średnia masa ciała samców i samic szczurów wynosiła odpowiednio  $351,00 \pm 14,45$  g i  $195,75 \pm 10,44$  g ( $p \leq 0,0001$ ). Zwierzęta były utrzymywane w standardowych klatkach laboratoryjnych po dwa szczury na klatkę. Szczury odmiennej płci utrzymywano osobno w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze i wilgotności (odpowiednio  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  i  $55 \pm 10\%$ ) w warunkach 12-godzinne go cyklu światło–ciemność. Szczury były karmione standardową paszą laboratoryjną *ad libitum* (Labofeed B, Polska) i miały swobodny dostęp do wody. Eksperymenty zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (numer pozwolenia: 63/2017) i przeprowadzono je zgodnie z przepisami Unii Europejskiej oraz polskiego prawa o ochronie zwierząt. W wykonaniu wszystkich eksperymentalnych protokołów stosowano zasadę 3R, aby zminimalizować cierpienie i ograniczyć liczbę wykorzystywanych zwierząt.

Zwierzęta zostały poddane eutanazji za pomocą przedawkowania pentobarbitalu sodu (Morbital, 180 mg/kg, i.p.). Skórę i część zewnętrznych mięśni usunięto z lewych i prawych kończyn tylnych. Preparaty tylnej kończyny zawierające kości i mięśnie (w tym przyśrodkowe brzuchate łydki) w neutralnej długości i przymocowane do stopy i kości udowej były przechowywane w 4-procentowym roztworze formaliny przez siedem dni w celu utrwalenia mięśni w ich normalnym kształcie. Wyizolowane mięśnie zostały wycięte i zważone (bez ścięgna Achillesa). Średnia masa mięśni wynosiła  $1,08 \pm 0,08$  g i  $0,66 \pm 0,07$  g odpowiednio dla samców i samic ( $p \leq 0,0001$ ). Mięśnie zostały następnie ponownie zanurzone w 4-procentowym roztworze formaliny.

Po trwającym 3–5 dni utrwaleniu w 10-procentowej obojętnej formalinie mięśnie odwodniono w serii roztworów etanolu (50–96-procentowych) i benzoesanu metylu oraz osadzono w parafinie. Następnie zostały pocięte poprzecznie od bliższego do dalszego przyczepu mięśnia przy użyciu mikrotomu rotacyjnego Leica RM 2055, aby uzyskać skrawki seryjne o grubości 5–20  $\mu\text{m}$ . Skrawki barwiono metodą Massona–Goldnera w celu obliczenia liczby wrzecion mięśniowych i określenia/oszacowania ich precyzyjnego rozmieszczenia w mięśniach. Uzyskane utrwalone mięśnie były deparafinizowane, a następnie płukane w trzech szeregach rozcieńczenia ksylenu przez 5 minut każdy, odwadniane w zstępującej serii roztworów alkoholu (dwa razy w 96-procentowym alkoholu przez 3 minuty, w 90-procentowym alkoholu przez 3 minuty, w 80-procentowym alkoholu przez 3 minuty i w 70-procentowym alkoholu przez 3 minuty), po czym skrawki płukano w wodzie destylowanej przez 5 minut. Skrawki były następnie barwione w roztworze hematoksyliny Mayera przez 10–15 minut, po czym spłukiwano je ciepłą wodą z kranu przez 10 minut i płukano w wodzie destylowanej przez kolejne 10 minut. Dalej skrawki barwiono w kwaśnym roztworze fuksyny przez 10 minut i płukano w wodzie destylowanej, różnicowano w roztworze kwasu fosfomolibdenowego przez 3 minuty, barwiono w roztworze błękitu anilinowego przez 10 minut, płukano w wodzie destylowanej, po czym poddawano filtracji w wodzie destylowanej i różnicowano w 1-procentowym roztworze kwasu octowego przez 1 minutę. Wybarwione skrawki odwadniano we wstępującej serii etanolu (płukanie w 70-procentowym i 80-procentowym etanolu przez 30 sekund, 90-procentowym przez 5 minut i dwa razy w 96-procentowym przez 5 minut) oraz toluenie (w trzech szeregach rozcieńczeniowych przez 5 minut każdy) i ostatecznie

montowano je na szkiełkach podstawowych przy użyciu medium DPX, zamykając skrawki szkiełkiem nakrywkowym.

Pomiary właściwości wrzecion mięśniowych wykonano za pomocą mikroskopu świetlnego Nikon Optihot-2 z wykorzystaniem programu NIS-Elements Basic Research software. W pierwszej kolejności wyszukiwano i identyfikowano badane receptory mięśniowe. Analizowano liczbę wrzecion mięśniowych, obliczano ich gęstość w mięśniu, liczbę i rozmiar włókien intrafuzalnych oraz wykonywano pomiary morfometryczne całych receptorów (krótkiej i długiej średnicy wrzecion mięśniowych) łącznie w 10 mięśniach, gdyż 2 mięśnie utracono podczas ich utrwalania.

W celu wykonania schematów przestrzennego rozmieszczenia wrzecion mięśniowych wybrano 10 mięśni samców i 10 mięśni samic i proporcjonalnie każdy mięsień podzielono na 10 sektorów wzdłuż osi długiej danego mięśnia w taki sposób, żeby każdy sektor zawierał taką samą liczbę skrawków (w przypadku samców, których mięśnie były dłuższe, liczba skrawków w jednej części była większa). Obliczano łączną liczbę wrzecion w każdym sektorze mięśnia i na tej podstawie szacowano częstość ich występowania w osi proksymalno-dystalnej mięśnia.

Aby przedstawić wizualizację 3D przykładowego mięśnia samca, wykonano zdjęcia mikroskopem optycznym Axioskop 2 Plus (Zeiss) z wykorzystaniem programu Gryphax i zebrano fotografie wszystkich skrawków mięśnia, po czym scalono je w programie komputerowym Amira (Thermo Fisher Scientific, 2020). Zaznaczono receptory w obrębie przykładowego mięśnia i całość materiału przedstawiono w postaci trzech animacji w formacie MP4 wykonanych w dwóch osiach wybranego mięśnia, odpowiednio:  $2 \times Z$  i  $1 \times Y$ . Ta część analiz została wykonana w Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Do określenia długości wrzecion w mięśniach użyto metody, w której podstawą obliczeń były grubość i liczba skrawków histologicznych, zawierających wrzeciona mięśniowe.

Do wykonania analiz statystycznych pomiarów morfometrycznych wrzecion mięśniowych oraz do ustalenia rozłożenia przestrzennego i pomiarów długości wrzecion mięśniowych zastosowano program Statistica 13.0 software (TIBCO Software Inc., 2017, Tulsa, OK, USA).

## 5. WYNIKI

Wyniki badań potwierdziły hipotezy 1, 2 i 4 oraz pozwoliły na odrzucenie hipotezy 3. Wykazano brak różnic w odniesieniu do liczby i cech morfometrycznych oraz przestrzennego rozmieszczenia wrzecion mięśniowych i ich długości w tym mięśniu u samców i samic szczurów Wistar, odnotowano natomiast różnicę dotyczącą gęstości wrzecion mięśniowych, która była o około 36% większa u samic.

Analizie poddano wrzeciona mięśniowe zidentyfikowane w 10 mięśniach samców i 10 mięśniach samic. Zbadano gęstość receptorów, a dla określenia ich cech morfometrycznych dokonano pomiarów łącznie 159 wrzecion samców i 180 wrzecion samic, natomiast dla przedstawienia rozmieszczenia przestrzennego i długości wrzecion mięśniowych wykorzystano dane dla 148 wrzecion u samców i 152 wrzecion u samic. Mniejsza liczba wrzecion analizowanych na drugim etapie badań wynikała z jakości materiału histologicznego i braku możliwości przeprowadzenia analiz w dwóch mięśniach (zrezygnowano z analiz danych dla jednego mięśnia samicy i jednego mięśnia samca).

Wykazano brak różnic w zakresie średniej liczby wrzecion mięśniowych w badanym mięśniu u samców i samic – wynosiła ona odpowiednio  $14,45 \pm 2,77$  i  $15,00 \pm 3,13$ . Przy uwzględnieniu masy tego mięśnia (średnio 1,08 i 0,66 g odpowiednio dla samców i samic) obliczono, że gęstość wrzecion mięśniowych była większa u samic i jedno wrzeciono przypadało na 51,14 mg masy mięśnia, podczas gdy u samców jedno wrzeciono przypadało na 79,91 mg masy mięśnia ( $p < 0,001$ ), co stanowi około 36% różnicy. Analizując z kolei budowę wrzecion, nie odnotowano różnic między płciami w odniesieniu do średniej liczby włókien śródwrzecionowych w jednym receptorze ( $5,57 \pm 2,20$  i  $5,60 \pm 2,16$ ), jak też ich średnicy ( $5,16 \pm 2,43 \mu\text{m}$  i  $5,37 \pm 2,27 \mu\text{m}$  odpowiednio dla samców i samic). Całkowita (dla wszystkich wrzecion) liczba włókien śródwrzecionowych w jednym mięśniu wynosiła  $77,55 \pm 27,11$  i  $79,67 \pm 32,12$  odpowiednio dla samców i samic ( $p > 0,05$ ). Pomiary morfometryczne średnic wrzecion, wykonane w najszerszym przekroju (zazwyczaj pośrodku osi długiej wrzeciona), nie wykazały różnic międzypłciowych dotyczących krótszej średnicy wrzecion mięśniowych, która wynosiła  $25,85 \pm 10,04 \mu\text{m}$  i  $25,30 \pm 9,96 \mu\text{m}$  odpowiednio dla samców i samic, ani dłuższej średnicy wrzecion:  $48,99 \pm 20,73 \mu\text{m}$  i  $43,97 \pm 16,96 \mu\text{m}$  odpowiednio dla samców i samic ( $p > 0,005$ ).

Długość wrzecion mięśniowych mieściła się w zakresie 0,78–7,41 mm u samców (średnio  $3,30 \pm 1,47$  mm) oraz 0,68–6,54 mm u samic (średnio  $3,26 \pm 1,32$  mm) ( $p = 0,96$ ). Nie wykazano różnic statystycznych w zakresie średniej długości wrzecion mięśniowych w obrębie żadnego z 10 wyróżnionych sektorów analizowanych dla zwierząt obu płci ( $p = 0,059$ ).

Analiza przestrzennego rozłożenia wrzecion mięśniowych w badanym mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki wykazała, że wrzeciona mięśniowe u zwierząt obu płci rozmieszczone były w środkowych sektorach mięśni, o największej średnicy (sektory 4–6). Zaobserwowano, że w mięśniach obu płci średnio przypada 2,71  $\pm$  1,81 i 2,71  $\pm$  1,95 wrzeciona na jeden z 10 wyróżnionych sektorów ( $p = 1,00$ ). Ponadto uśredniona wzdłuż osi proksymalno-dystalnej dla wszystkich receptorów pozycja występowania wrzeciona mięśniowego przypadała średnio na piąty sektor (4,40 u samców i 4,18 u samic).

W celu lepszego zobrazowania wyników połączono dane z wszystkich skrawków i wykonano wirtualny model 3D mięśnia obrazujący przestrzenne rozmieszczenie wrzecion

mięśniowych w płaszczyznach  $2 \times Z$  i  $1 \times Y$ . Wizualizacja ta dla przykładowego mięśnia samca pozwala lepiej zilustrować, że wrzeczona są rozmieszczone głównie w centralnej części mięśnia.

## 6. DYSKUSJA

Jakkolwiek w większości dyscyplin sportowych zawody są organizowane oddzielnie dla sportowców obu płci (a w czasach antycznych brali w nich udział wyłącznie mężczyźni), decyzję o takiej organizacji rywalizacji podejmowano początkowo intuicyjnie oraz ze względu na uwarunkowania kulturowe. Warto zauważyć, że inicjatywy organizacji zawodów sportowych dla kobiet budziły kontrowersje. Przyjęto, że pólolimpiada dla kobiet byłaby niepraktyczna, nieestetyczna i nieciekawa. W efekcie kobietom zezwolono na start w igrzyskach olimpijskich po raz pierwszy dopiero w 1908 roku, ale tylko w dwóch dyscyplinach: tenisie i pływaniu (Młodzikowski i Hądziałka [oprac.] 1994). Wynikało to częściowo także z odmiennych predyspozycji motorycznych mężczyzn i kobiet do uprawiania różnych dyscyplin sportowych, choć stan podstawowej wiedzy dotyczącej różnic międzypłciowych był w tym okresie bardzo ograniczony. Dotychczas udowodniono, że podczas wysiłku fizycznego – głównie ze względu na odmienne wskaźniki biochemiczne i metaboliczne oraz wpływ układu hormonalnego – mężczyźni wykazują lepsze przystosowania do uprawiania sportów szybkościowych i wytrzymałościowych niż kobiety. Z kolei na precyzję ruchu może wpływać gęstość oraz rozmieszczenie receptorów mięśniowych, dając przewagę kobietom w testach i zawodach wymagających kontroli pozycji ciała i dokładności wykonywanych ruchów. Z tego względu czucie proprioceptywne (tzw. czucie głębokie) może decydować o odmiennych rezultatach osiąganych w rywalizacji sportowej u mężczyzn i u kobiet. Otrzymane w badaniach opisanych w niniejszym autoreferacie wyniki poszerzają więc stan wiedzy podstawowej w zakresie zróżnicowanych uwarunkowań motorycznych kobiet i mężczyzn.

Receptory mięśniowe, do których należą wrzeciona mięśniowe, zostały odkryte w 1862 roku (Kölliker 1862), jednak przez dość długi czas nie zidentyfikowano pełnionych przez nie funkcji (Matthews 1933; Sherrington 1907). Obecnie wiadomo, że są one częścią układu nerwowego, w którym pełnią funkcję receptorów odpowiedzialnych głównie za kontrolę pozycji i ruchów całego ciała (Grottel i Krutki 1996; Proske i Gandevia 2009). Barker (1974), podsumowując wcześniejsze badania Gregora, opublikowane w 1904 roku, wykazał, że gęstość wrzecion mięśniowych u człowieka jest największa w mięśniach dłoni, stopy i szyi, najdłuższe wrzeciona mięśniowe znajdują się w mięśniach barku i uda, a umiarkowaną gęstość wrzecion mięśniowych odnotowano w bardziej dystalnych mięśniach ramion i nóg, przy stosunkowo wysokich wartościach dla mięśni z wysokim kątem rotacji, takich jak np. czworoboczny. Duża gęstość wrzecion charakteryzuje mięśnie zaangażowane w inicjowanie drobnych ruchów (tj. łędźwiowe, gałki ocznej i małe mięśnie przykregosłupowe) lub utrzymywanie postawy (tj. płaszczkowaty). Z kolei małe zagęszczenie wrzecion mięśniowych zauważa się w mięśniach służących do wykonywania ruchów całym ciałem, takich jak: siadanie, raczkowanie, bieganie, skakanie, rzucanie piłką i wchodzenie po schodach (tj. mięsień brzuchaty łydki). Mimo to istnieje bardzo mało danych, które dotyczą różnic między płciami w zakresie cech wrzecion mięśniowych w mięśniach szkieletowych człowieka. Aktualnie prezentowane badania naukowe prowadzone na modelach zwierzęcych częściowo uzupełniają te braki.

Jedyne dostępne wcześniejsze doniesienia na temat różnic międzypłciowych dotyczących unerwienia czuciowego mięśni prążkowanych wskazują na większą o około 20% liczbę wrzecion mięśniowych u mężczyzn niż u kobiet w specyficznych mięśniach gałki ocznej



człowieka (Lukas i in. 1994). Brakowało natomiast jakichkolwiek danych odnoszących się do mięśni szkieletowych kończyn. Niedawno opisano, że podobna liczba  $\gamma$ -motoneuronów unerwia systematycznie badany w pracowni Zakładu Neurobiologii AWF Poznań mięsień brzuchaty przyśrodkowy łydki u szczurów obu płci, co stało się podstawą hipotezy, że mięsień ten u samców i samic odznacza się podobną liczbą wrzecion mięśniowych (Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2011). Hipoteza ta została potwierdzona otrzymanymi wynikami. Ponadto wykazana w badaniach zaprezentowanych w niniejszym autoreferacie liczba receptorów w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki jest potwierdzeniem wyników innych autorów dotyczących tego mięśnia u samców szczurów różnych szczepów. U szczurów Fischer w wieku 6,5–29,5 miesiąca zaobserwowano 11–15 wrzecion w tym mięśniu (Kim i in. 2007), a u szczurów Wistar w wieku 3–5,5 miesiąca stwierdzono 15–16 wrzecion mięśniowych (Muramatsu i in. 2017). Ponadto średnia liczba wrzecion mięśniowych u 8-miesięcznych szczurów Fischer 344 wynosiła  $16,7 \pm 0,96$  (Asano i in. 2019).

Przeprowadzone przez nas badania wskazują, że średnia długość wrzecion mięśniowych w mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki wynosi  $3,30 \pm 1,47$  mm u samców i  $3,26 \pm 1,32$  mm u samic Wistar. Długość wrzecion mięśniowych u różnych gatunków ssaków jest prawdopodobnie skorelowana z długością i masą całego mięśnia. Dostępne dane literaturowe precyzują, że w mięśniach kota i człowieka występują wrzeciona mięśniowe o istotnie większej długości, mianowicie 8–10 mm (Boyd 1962). Z kolei mięsień napinacz błony bębenkowej w uchu człowieka zawiera wrzeciona o długości 1,49 mm, a w mięśniu strzemiączkowym ucha występują wrzeciona o długości 0,49 mm (Kierner i in. 1999). Mięśnie długi szyi i wielodzielny człowieka zawierają wrzeciona o długości 1,5–4 mm (Boyd-Clark i in. 2002). Najkrótsze wrzeciona mięśniowe opisano w mięśniach myszy C57BL/6: piszczelowym przednim i długim prostowniku palców (długość do 2 mm), podczas gdy mięsień brzuchaty łydki i mięsień płaszczkowaty zawierają wrzeciona o długości do 1,5 mm (Lian i in. 2022).

Wśród badanych aspektów propriocepcji podstawowa okazała się różnica w gęstości wrzecion mięśniowych – znacząco wyższa w mięśniach samic, co stanowiło potwierdzenie hipotezy 2. Wykazano, że jedno wrzeciono przypadało na 51,14 mg masy mięśnia u samców, a u samic – na 79,91 mg masy mięśnia, co stanowi około 36-procentową różnicę. Odpowiada to 19,55 wrzeciona na 1 g masy mięśnia u samców i 12,51 wrzeciona u samic. We wcześniejszych analizach Al-Mallak (2006) ustalił, że gęstość wrzecion w całym mięśniu brzuchatym łydki wynosiła 5,78 wrzeciona na 1 g masy mięśnia u dorosłych szczurów. Ponadto w publikacji przeglądowej Banks (2006) podał, że gęstość wrzecion wynosiła 40,3 wrzeciona na 1 g masy ciała szczura, 6,5 wrzeciona na 1 g masy ciała kota oraz 0,40 wrzeciona na 1 g masy ciała człowieka. Oba powyższe badania nie obejmowały analizy różnic międzypłciowych w odniesieniu do gęstości wrzecion mięśniowych.

Liczba włókien mięśniowych śródwrzecionowych w mięśniach gałki ocznej człowieka wynosi 2–12 (Bruenech i Ruskell 2001), a w tych samych mięśniach krowy 1–16 (Maier 2000). Natomiast u szczurów Sprague-Dawley zaobserwowano 2–5 włókien (Lennartsson 1980), a u samców szczurów Wistar zidentyfikowano średnio 4,3 włókna na wrzeciono (Muramatsu i in. 2017). Jest to porównywalne z wynikami uzyskanymi w badaniach prezentowanych w niniejszym autoreferacie, gdyż zaobserwowaliśmy średnio  $5,57 \pm 2,20$  i  $5,60 \pm 2,16$  włókna mięśniowego w jednym wrzecionie odpowiednio dla samców i samic.

Średnica włókien mięśniowych była słabo poznana. Korzeniowska-Kromer i Wójtowicz-Kaczmarek (2003) podają, że u płodów człowieka średnica włókien śródwrzecionowych w mięśniu podnośniku powiek wynosiła 2–20  $\mu\text{m}$ . Brak jest danych dla różnych ssaków, stąd przedstawiane w niniejszej rozprawie badania jako pierwsze wskazują, że

średnio jest to  $5,16 \pm 2,43 \mu\text{m}$  i  $5,37 \pm 2,27 \mu\text{m}$  odpowiednio dla samców i samic szczurów. Dane te stały się podstawą do odrzucenia hipotezy 3 o zróżnicowaniu średnicy włókien mięśniowych śródwrzecionowych. Hipoteza ta wynikała m.in. z badań średnicy włókien mięśniowych zewnątrzwrzecionowych (Mierzejewska-Krzyżowska i in. 2011), w których wykazano, że u samców średnica ta była o około 14% większa i wynosiła średnio  $57,99 \pm 6,41 \mu\text{m}$  (u samic  $50,86 \pm 4,89 \mu\text{m}$ ).

Wyniki badań rozmiarów wrzecion mięśniowych również nie potwierdziły hipotezy 3 (oczekiwano większych wrzecion w mięśniach samców), natomiast potwierdzają dostępne dane literaturowe. Jako maksymalną średnicę wrzeciona dla całego mięśnia brzuchatego łydki podano około  $42,29 \pm 3,04 \mu\text{m}$  dla dorosłych szczurów Lewis (Elsohemy i in. 2009), podobnie dla samców i samic szczurów Sprague-Dawley tworzących jedną grupę: średnio  $42,9 \pm 5,5 \mu\text{m}$  dla mięśnia brzuchatego łydki (Pang i in. 2014), jednak dane te nie prezentują wyników z uwzględnieniem płci zwierząt. Z kolei wielkość wrzecion u bardzo młodych 25–35-dniowych szczurów Wistar mieściła się w zakresie  $15\text{--}85 \mu\text{m}$  (Sekiya i in. 1986). W naszych badaniach ustaliliśmy, że krótsze średnice wrzecion mięśniowych wynoszą  $25,85 \pm 10,04 \mu\text{m}$  oraz  $25,30 \pm 9,96 \mu\text{m}$ , a dłuższe –  $48,99 \pm 20,73 \mu\text{m}$  oraz  $43,97 \pm 16,96 \mu\text{m}$  odpowiednio dla samców i samic Wistar, a zatem obserwacje dokonane w kilku laboratoriach są zgodne.

Analiza rozmieszczenia wrzecion mięśniowych w badanym mięśniu brzuchatym przyśrodkowym łydki szczurów Wistar wykazała, że receptory te są rozmieszczone głównie w proksymalnej części mięśnia, a zarówno rozmieszczenie wrzecion mięśniowych, jak i ich długość u samców i samic są podobne pomimo znacznych różnic w masie i wielkości mięśni. Rozłożenie wrzecion mięśniowych było opisywane w szeregu publikacji, których wyniki dowiodły, że lokalizacja tych receptorów jest w istotny sposób zróżnicowana dla rozmaitych mięśni. Wykazano m.in., że receptory te znajdują się w środkowej części mięśnia w jego osi proksymalno-dystalnej: w mięśniu wielodzielnym u owcy (James i in. 2022), w mięśniu dwubrzuscowym u człowieka (Saverino i in. 2014), w mięśniach żwacza u królika (Bredman i in. 1991). Z kolei w mięśniach kończyn tylnych kota, m.in. w prostowniku uda, znaczne zagęszczenie wrzecion występowało w części proksymalnej (Barker i Chin 1960). Z kolei Scott i Young (1987) dla mięśni stopy strzałkowego trzeciego i długiego wykazali obecność większej liczby wrzecion w części proksymalnej kończyny tylnej. U myszy C57BL/6 zaobserwowano natomiast znaczną liczbę wrzecion w najszerzej części mięśnia, rozłożonych na długości 20–90% całego mięśnia (Zeller-Plumhoff i in. 2017). Jest to zgodne z wynikami badań prezentowanych w niniejszym autoreferacie, które wskazują na znaczne zagęszczenie wrzecion mięśniowych w środkowych sektorach mięśnia (sektory 4–6) i większą ich liczbę w części proksymalnej, a występowanie tylko pojedynczych wrzecion w części dystalnej mięśnia. Wyniki naszych badań przyczyniają się więc do poszerzenia wiedzy o lokalizacji tych najważniejszych proprioreceptorów mięśni szkieletowych.

Wykorzystaną po raz pierwszy w naszych badaniach technikę rekonstrukcji 3D mięśnia brzuchatego przyśrodkowego łydki, która posłużyła do analiz przestrzennego rozmieszczenia wrzecion mięśniowych, można uznać za nowatorskie i przydatne narzędzie do dalszych badań oceniających unerwienie czuciowe mięśni szkieletowych. Zastosowanie tej metody stało się możliwe dzięki postępowi technicznemu i informatycznemu, ale ze względu na jej pionierski charakter brakuje do dyskusji materiału porównawczego z innych publikacji. We wcześniejszych badaniach przedstawiano mniej zaawansowane wizualizacje 2D różnych mięśni (także całego mięśnia brzuchatego) u samic myszy (Lian i in. 2022), nie uwzględniając problemu wpływu płci na wynik analiz. W jednej publikacji przedstawiono wykresy ilustrujące rozłożenie i długość wrzecion mięśniowych tylko

w jednej (podłużnej) osi mięśnia u samców myszy, jednak bez oceny średniej długości i porównania wyników pomiędzy płciami (Zeller-Plumhoff i in. 2017).

W podsumowaniu powyższej dyskusji wyników badań należy podkreślić, że większość cech morfometrycznych wrzecion mięśniowych oraz ich liczba są zgodne z danymi literaturowymi. Ten fakt potwierdza wartość i precyzję dokonanych obserwacji, a zarazem uwiarygodnia wnioski płynące z badań mających na celu wyjaśnienie różnic między płciami w zakresie unerwienia czuciowego badanego mięśnia.

Prowadzenie badań biomedycznych na modelach zwierzęcych i transponowanie wyników badań na ludzi wynika zarówno z dostępności materiału badawczego, jak i względów etycznych. Istotnym aspektem wyników prezentowanych badań uzyskanych u szczura jest ich powiązanie z czynnością układu nerwowo-mięśniowego człowieka. Wykazano, że głównym wynikiem różnicującym uwarunkowania czucia głębokiego u osobników obu płci jest większa gęstość receptorów w mięśniach osobników płci żeńskiej. Oczywiście wyniki te nie stanowią ostatecznej odpowiedzi na pytania dotyczące potencjalnych różnic międzypłciowych w odniesieniu do czucia głębokiego, m.in. nie ma żadnych danych z doświadczeń elektrofizjologicznych wskazujących, jak wrzeciona mięśni samców i samic odpowiadają na rozciąganie mięśni. Niemniej już przy obecnym stanie wiedzy można się pokusić o wskazanie znaczenia prezentowanych wyników badań dla wyjaśnienia różnic między płciami w zakresie precyzji wykonywanych ruchów. Zaobserwowane różnice dotyczące gęstości wrzecion mięśniowych między mężczyznami i kobietami mogą więc stanowić część uwarunkowania lepszej orientacji wzrokowo-przestrzennej (Sigmundson i in. 2007), a także umiejętności precyzyjnego pisanja (Hartley 1991) u kobiet oraz mniejszej kontroli czucia pozycji stawu barkowego u mężczyzn (Vafadar i in. 2015).

Hipotezę badawczą 3 dotyczącą zróżnicowania międzypłciowego w zakresie cech morfometrycznych wrzecion mięśniowych oparto na wynikach badań wskazujących na rolę hormonów męskich w rozwoju organizmu (English i Schwartz 2002). Uznano, że czynnikami wpływającymi na rozmiary wrzecion mięśniowych i włókien śródwrzecionowych mogą być hormony męskie działające od 8. tygodnia życia płodowego podczas rozwoju mięśni (Fitz-Ritson 1982; Gegenhuber i in. 2022). Hipoteza ta została odrzucona, a prawdopodobny brak wpływu tych hormonów na wrzeciona mięśniowe tłumaczy się ochronnym (izolującym) działaniem kapsuły kolagenowej otaczającej wrzeciono mięśniowe (Keenedy i Yoon 1979) lub niewrażliwością włókien śródwrzecionowych na działanie tych hormonów, gdyż różnicowanie tych włókien trwa do 12. tygodnia życia płodowego, choć wydłużanie wrzecion mięśniowych ma miejsce nawet po urodzeniu (Fitz-Ritson 1982). Ponadto wykazano, że w żwaczu i mięśniu dwugłowym człowieka dojrzewanie wrzecion mięśniowych zachodzi wcześniej niż dojrzewanie włókien zewnątrzwrzecionowych (Österlund i in. 2011), co może powodować, że działanie tych męskich hormonów w przypadku włókien mięśniowych śródwrzecionowych podczas rozwoju organizmu jest zbyt opóźnione, a to z kolei wyjaśniać może brak międzypłciowych różnic morfometrycznych w odniesieniu do cech wrzecion mięśniowych.

Niedawno opublikowane badania elektrofizjologiczne przeprowadzone na szczurach Wistar (w ramach tego samego projektu NCN co przedstawiane badania) wykazały – wbrew oczekiwaniom – brak różnic międzypłciowych w zakresie podstawowych cech elektrofizjologicznych  $\alpha$ -motoneuronów. Wykazano, że właściwości błony komórkowej motoneuronów, ich potencjał spoczynkowy i czynnościowy oraz cechy wyładowań wywołanych podawanym prądem dokomórkowym nie różniły się dla zwierząt obu płci, chociaż jednocześnie potwierdzono różnice badanych cech dla szybkich i wolnych typów neuronów ruchowych w obrębie każdej z dwu badanych grup zwierząt (Drzymała-Celichowska i in. 2022). W kolejnej serii doświadczeń dotyczących wpływów monosynaptycznych la

(czyli wpływów włókien czuciowych z czuciowych zakończeń pierwotnych wrzecion mięśniowych), analizowanych dla pobudzających potencjałów postsynaptycznych (EPSP) wywołanych stymulacją nerwu, wykazano, że średnia maksymalna amplituda EPSP była o 26% wyższa u samców ( $4,83 \pm 1,57$  mV) niż u samic ( $3,84 \pm 1,23$  mV) szczurów Wistar. Średni czas narastania EPSP, czas połowicznego zaniku pobudzenia oraz całkowity czas jego trwania nie różniły się między płciami. Zwrócono uwagę, że obserwowane różnice w aferentacjach Ia mogą być związane albo z biomechanicznymi różnicami w zakresie obciążenia mięśni kończyn tylnych u samców i samic, wynikającymi z różnej masy ciała, albo różnicami hormonalnymi w neuromodulacji występującej w obwodach rdzeniowych (Krutki i in. 2023).

Przeprowadzone badania morfometryczne wrzecion mięśniowych, opisane w niniejszej rozprawie, cechują pewne ograniczenia. Po pierwsze, brakuje w nich opisu struktury zakończeń Ia (pierwotnych) i II (wtórnych), co jest możliwe do uzyskania głównie metodami immunohistochemicznymi (Sonner i in. 2017; Wu i in. 2019), które nie były stosowane. Po drugie, nie przeprowadzono oznaczenia rozmieszczenia wrzecion w dwóch przedziałach badanego mięśnia: bliższym i dalszym, które mogłoby zostać wykonane np. techniką wyczerpywania glikogenu (Taborowska i in. 2016). Po trzecie, w badaniach nie oznaczono i nie zróżnicowano także badanych włókien mięśniowych śródwrzecionowych na dwa podstawowe typy: worka jądrowego i łańcucha jądrowego.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszych badaniach morfologicznych i histologicznych, dotyczące szeregu cech wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki szczura, częściowo potwierdzają przyjęte hipotezy badawcze. Liczba, cechy morfometryczne i rozłożenie wrzecion mięśniowych oraz cechy morfometryczne włókien śródwrzecionowych w badanym mięśniu osobników obu płci są podobne, natomiast gęstość wrzecion jest w istotnym stopniu większa u samic. Dokonane obserwacje mogą sugerować ograniczony wpływ hormonów męskich na rozwój wrzecion mięśniowych.

Otrzymane dane stanowią poszerzenie stanu wiedzy podstawowej wyjaśniającej konieczność prowadzenia zawodów sportowych w różnych dyscyplinach osobno w kategoriach mężczyzn i kobiet. Wykazane różnice w zakresie gęstości wrzecion mięśniowych częściowo wyjaśniają większą precyzję ruchów kobiet. Wydaje się, że rola wrzecion mięśniowych może mieć szczególne znaczenie w sportach wymagających precyzji ruchów, jak łucznictwo czy strzelanie precyzyjne, choć pod względem różnic międzypłciowych nie została ona dotychczas jednoznacznie potwierdzona (Czarnota i Walicka-Cupryś 2022; Jamro i in. 2022; Laborde i in. 2009; Mon-López i in. 2020).

## 7. WNIOSKI

W ramach niniejszej rozprawy wykazano, że w mięśni przyśrodkowym brzuchatym łydki szczura:

- 1) brak jest różnic między płciami w zakresie liczby wrzecion mięśniowych;
- 2) istnieje znacząca różnica między płciami w zakresie gęstości wrzecion mięśniowych – u samic gęstość jest o około 36% większa niż u samców;
- 3) brak jest różnic między płciami w zakresie liczby i średnicy włókien śródwrzecionowych;
- 4) brak jest różnic między płciami w zakresie średnic wrzecion mięśniowych;
- 5) brak jest różnic między płciami w zakresie długości wrzecion mięśniowych;
- 6) wrzeciona mięśniowe są rozłożone przede wszystkim w proksymalnej części mięśnia u obu płci;
- 7) technika 3D rekonstrukcji mięśnia jest użytecznym narzędziem przestrzennego obrazowania rozłożenia wrzecion mięśniowych.



## 8. PIŚMIENNICTWO

- Al-Mallak M.K. (2006) Histological study on neuromuscular receptors of rat skeletal muscles. *Bas. J. Vet. Res.* 5, 44–56.
- Asano K., Nakano T., Tokutake K., Ishii H., Nishizuka T., Iwatsuki K. (2019) Muscle spindle reinnervation using transplanted embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve transection in rats. *Cell. Prolifer.* 52, e12660. <https://doi.org/10.1111/cpr.12660>
- Banks R.W. (2006) An allometric analysis of the number of muscle spindles in mammalian skeletal muscles. *J. Anat.* 208, 753–768. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00558.x>
- Barker D. (1974) The morphology of muscle receptors. W: Hunt C.C. (ed.), *Handbook of sensory physiology*. New York: Springer-Verlag, 90–95.
- Barker D., Chin N.K. (1960) The number and distribution of muscle-spindles in certain muscles of the cat. *J. Anat.* 94 (4), 473–486.
- Besson T., Macchi R., Rossi J., Morio C.Y.M., Kunimasan Y., Nicol C., Vercruyssen F., Millet F.G. (2022) Sex differences in endurance running. *Sports Med.* 52, 1235–1257. <https://doi.org/10.1007/s40279-022-01651-w>
- Boyd I.A. (1962) The structure and innervation of the nuclear bag muscle fibre system and the nuclear chain muscle fibre system in mammalian muscle spindles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 245 (731), 81–136. <https://doi.org/10.1098/rstb.1962.0007>
- Boyd-Clark L.C., Briggs C.A., Galea M.P. (2002) Muscle spindle distribution, morphology, and density in longus colli and multifidus muscles of the cervical spine. *Spine.* 27 (7), 694–701. <https://doi.org/10.1097/00007632-200204010-00005>
- Bredman J.J., Weijs W.A., Brugman P. (1991) Relationships between spindle density, muscle architecture and fibre type composition in different parts of the rabbit masseter. *Euro. J. Morphol.* 29, 297–307.
- Bruenech J.R., Ruskell G.L. (2001) Muscle spindles in extraocular muscles of human infants. *Cells Tissues Organs.* 169, 388–394. <https://doi.org/10.1159/000047906>
- Buchthal F., Schmalbruch H. (1980) Motor unit of mammalian muscle. *Physiol. Rev.* 60 (1), 90–142. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.1.90>
- Chow R.S., Medri M.K., Martin D.C., Leekam R.N., Agur A.M., McKee N.H. (2000) Sonographic studies of human soleus and gastrocnemius muscle architecture: Gender variability. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82 (3), 236–244. <https://doi.org/10.1007/s004210050677>
- Collado-Boira E., Baliño P., Boldo-Roda A., Martínez-Navarro I., Hernando B., Recacha-Ponce P., Hernando C., Muriach M. (2021) Influence of female sex hormones on ultra-running performance and post-race recovery: role of testosterone. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 18, 10403. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910403>
- Czarnota M., Walicka-Cupryś K. (2022) Is there influence of gender and the specificity of sports activities on the performance of body balance in young athletes? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19 (22), 15037. <https://doi.org/10.3390/ijerph192215037>
- Devan B.D., Tobin E.L., Dunn Ch. (2016) Sex differences on the competitive place task in the water maze: The influence of peripheral pool time on spatial navigation performance in rats. *Behav. Processes.* 132, 34–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2016.09.009>

- Dimitriou M. (2022) Human muscle spindles are wired to function as controllable signal-processing devices. *eLife*. 11, e78091. <https://doi.org/10.7554/eLife.78091>
- Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. (2020) Czy cechy skurczu mięśni szkieletowych są zależne od płci? *Kosmos*. 69 (4), 663–672. [https://doi.org/10.36921/kos.2020\\_2712](https://doi.org/10.36921/kos.2020_2712)
- Drzymała-Celichowska H., Celichowski J., Bączyk M., Krutki P. (2022) The electrophysiological properties of hindlimb motoneurons do not differ between male and female rats. *Eur. J. Neurosci*. 56, 4176–4186. <https://doi.org/10.1111/ejn.15745>
- Eldred E., Yung L., Eldred D., Roy R.R. (1998) Distribution of muscle spindles in a simply structured muscle: integrated total sensory representation. *Anat. Rec.* 251, 161–172. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199806\)251:2<161::AID-AR3>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199806)251:2<161::AID-AR3>3.0.CO;2-1)
- Elsohemy A., Butler R., Bain J.R., Fahnestock M. (2009) Sensory protection of rat muscle spindles following peripheral nerve injury and reinnervation. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 1860–1868. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181bcee47>
- English A.W., Schwartz G. (2002) Development of sex differences in the rabbit masseter is not restricted to a critical period. *J. Appl. Physiol.* 92, 1214–1222. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00953.2001>
- Fitz-Ritson D. (1982) The anatomy and physiology of the muscle spindle, and its role in posture and movement: a review. *J. Can. Chiropr. Assoc.* 26 (4), 144–150.
- Gegenhuber B., Wu M.V., Bronstein R., Tollkuhn J. (2022) Gene regulation by gonadal hormone receptors underlies brain sex differences. *Nature*. 606, 153–159. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04686-1>
- Górski J. (red.) (2006) Fizjologiczne podstawy wysiłku fizycznego. Wyd. 2. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Grottell K., Krutki P. (1996) Organizacja mięśnia i sterowanie ruchem. Część II: Sterowanie ruchem. Warszawa, Poznań: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Gutiérrez-Menéndez A., Méndez M., Arias J.L. (2023) Learning and metabolic brain differences between juvenile male and female rats in the execution of different training regimes of a spatial memory task. *Physiol. Behav.* 267, 114203. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114203>
- Ha P.L., Dalton B.E., Alesi M.G., Smith T.M., VanDusseldorp T.A., Feito Y., Hester G.M. (2022) No sex differences in evoked contractile properties after fatiguing isometric and isotonic exercise for the plantar flexors. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 22 (4), 504–513.
- Hartley J. (1991) Sex differences in handwriting: a comment on spear. *Br. Educ. Res. J.* 17 (2), 141–145. <https://doi.org/10.1080/0141192910170204>
- Hirschberg A.L. (2020) Female hyperandrogenism and elite sport. *Endocr. Connect.* 9, R81–R92. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0537>
- Hu X., Li J., Wang L. (2020) Sex differences in lower limb proprioception and mechanical function among healthy adults. *Motor Control*. 24 (4), 571–587. <https://doi.org/10.1123/mc.2020-0015>
- James G., Stecco C., Blomster L., Hall L., Schmid A.B., Shu C.C., Schug S.A. (2022) Muscle spindles of the multifidus muscle undergo structural change after intervertebral disc degeneration. *Eur. Spine J.* 31, 1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s00586-022-07235-6>
- Jamro D., Żurek G., Dulnik M., Lachowicz M., Lenart D. (2022) Executive function level in cadets' shooting performance. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. 19 (10), 6007. <https://doi.org/10.3390/ijerph19106007>
- Johansson A.M., Grip H., Rönqvist L., Selling J., Boraxbekk C.-J., Strong A., Häger C.K. (2021) Influence of visual feedback, hand dominance and sex on individuated finger movements. *Exp. Brain Res.* 239, 1911–1928. <https://doi.org/10.1007/s00221-021-06100-0>



- Kennedy W.R., Yoon K.S. (1979) Permeability of muscle spindle capillaries and capsule. *Muscle Nerve*. 2 (2), 101–108. <https://doi.org/10.1002/mus.880020204>
- Kierner A.C., Zelenka I., Lukas J.R., Aigner M., Mayr R. (1999) Observations on the number, distribution and morphological peculiarities of muscle spindles in the tensor tympani and stapedius muscle of man. *Hear. Res.* 135 (1–2), 71–77. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(99\)00092-1](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(99)00092-1)
- Kim G.H., Suzuki S., Kanda K. (2007) Age-related physiological and morphological changes of muscle spindles in rats. *J. Physiol.* 582 (2), 525–538. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130120>
- Kölliker A. (1862) Untersuchungen über die letzten Endigungen der Nerven. *Z. wiss. Zool.* 12, 149–164.
- Korzeniowska-Kromer E., Wójtowicz-Kaczmarek K. (2003) Muscle spindles in the levator palpebrae superioris muscle of human fetuses. *Folia Morphol.* 62, 289–290.
- Krutki P., Drzymała-Celichowska H., Bączyk M., Piotr M., Celichowski J. (2023) Differences in Ia proprioceptive input to spinal motoneurons between male and female rats. *Eur. J. Neurosci.* 58, 2504–2514. <https://doi.org/10.1111/ejn.16053>
- Laborde S., Dosseville F., Leconte P., Margas N. (2009) Interaction of hand preference with eye dominance on accuracy in archery. *Percept. Mot. Skills.* 108 (2), 558–564. <https://doi.org/10.2466/PMS.108.2.558-564>
- Lennartsson B. (1980) Number and distribution of muscle spindles in the masticatory muscles of the rat. *J. Anat.* 130, 279–288.
- Lian W., Hao F., Hao P., Zhao W., Gao Y., Rao J.-S. (2022) Distribution heterogeneity of muscle spindles across skeletal muscles of lower extremities in C57BL/6 mice. *Front. Neuroanat.* 16, 838951. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.838951>
- Liutsko L., Muiños R., Tous Ral J.M., Contreras M.J. (2020) Fine motor precision tasks: sex differences in performance with and without visual guidance across different age groups. *Behav. Sci.* 10 (1), 36. <https://doi.org/10.3390/bs10010036>
- Luchsinger H., Kocbach J., Ettema G., Sandbakk Ø. (2018) The contribution from cross-country skiing and shooting variables on performance-level and sex differences in biathlon World Cup individual races. *Int. J. Sports. Physiol. Perform.* 14 (2), 190–195. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2018-0134>
- Lukas J.R., Aigner M., Blumer R., Heinzl H., Mayr R. (1994) Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (13), 4317–4327.
- Maier A. (2000) Morphological variability and specializations in bovine extraocular muscle spindles. *Ann. Anat.* 182 (3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(00\)80031-X](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(00)80031-X)
- Márquez L.M., Alegre D., Jaén L., Martín-Casado H., Aguado X. (2017) Sex differences in kinetic and neuromuscular control during jumping and landing. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 17 (1), 409–416.
- Matthews B.H.C. (1933) Nerve endings in mammalian muscle. *J. Physiol.* 78 (1), 1–53.
- May A., Bramke S., Funk R.H.W., May C.A. (2018) The human platysma contains numerous muscle spindles. *J. Anat.* 232 (1), 146–151. <https://doi.org/10.1111/joa.12724>
- McComas A., deBruin H., Fu W. (2018) Quantitative input-output relationships between human soleus muscle spindle afferents and motoneurons. *J. Neurophysiol.* 119 (3), 887–893. <https://doi.org/10.1152/jn.00273.2017>
- Mierzejewska-Krzyżowska B., Bukowska D., Taborowska M., Celichowski J. (2014) Sex differences in the number and size of motoneurons innervating rat medial gastrocnemius muscle. *Anat. Histol. Embryol.* 43 (3), 182–189. <https://doi.org/10.1111/ahe.12060>

- Mierzejewska-Krzyżowska B., Drzymała-Celichowska H., Celichowski J. (2011) Gender differences in the morphometric properties of muscle fibres and the innervation ratio of motor units in rat medial gastrocnemius muscle. *Anat. Histol. Embryol.* 40 (4), 249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2011.01066.x>
- Młodzikowski G., Hądziałka K. (oprac.) (1994) Pierre de Coubertin. Przemówienia. Pisma różne i listy. Biblioteka Polskiego Towarzystwa Naukowego Kultury Fizycznej, t. 2. Warszawa: PTNKF „Lea”.
- Mon-López D., Tejero-González C.M., de la Rubia Ríaza A., Calvo J.L. (2020) Pistol and rifle performance: gender and relative age effect analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17 (4), 1365. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041365>
- Muramatsu K., Niwa M., Tamaki T., Ikutomo M., Masu Y., Hasegawa T. (2017) Effect of streptozotocin-induced diabetes on motoneurons and muscle spindles in rats. *Neurosci. Res.* 115, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.10.004>
- Österlund C., Liu J.-X., Thornell L.-E., Eriksson P.-O. (2011) Muscle spindle composition and distribution in human young masseter and biceps brachii muscles reveal early growth and maturation. *Muscle Biol.* 294 (4), 683–693. <https://doi.org/10.1002/ar.21347>
- Pang Y., Hong Q., Zheng J. (2014) Sensory reinnervation of muscle spindles after repair of tibial nerve defects using autogenous vein grafts. *Neural. Regen. Res.* 9 (6), 610–615. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.130103>
- Popesko P., Rajtová V., Horák J. (2011) Atlas anatomii małych zwierząt laboratoryjnych. Warszawa: Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- Prochazka A. (2021) Proprioception: Clinical relevance and neurophysiology. *Curr. Opin. Physiol.* 23, 100440. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2021.05.003>
- Proske U. (1997) The mammalian muscle spindle. *Physiology.* 12 (1), 37–42. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1997.12.1.37>
- Proske U., Gandevia S.C. (2009) The kinaesthetic senses. *J. Physiol.* 587 (17), 4139–4146. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.175372>
- Santuz A., Akay T. (2023) Muscle spindles and their role in maintaining robust locomotion. *J. Physiol.* 601 (2), 275–285. <https://doi.org/10.1113/JP282563>
- Saverino D., De Santanna A., Simone R., Cervioni S., Cattryse E., Testa M. (2014) Observational study on the occurrence of muscle spindles in human digastric and mylohyoid muscles. *Biomed Res. Int.* 294263. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/294263>
- Schulleri K.H., Johannsen L., Michel J., Lee K. (2022) Sex differences in the association of postural control with indirect measures of body representations. *Sci. Rep.* 12, 4556. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07738-8>
- Scott J.J., Young H. (1987) The number and distribution of muscle spindles and tendon organs in the peroneal muscles of the cat. *J. Anat.* 151, 143–155.
- Sekiya S., Homma S., Miyata Y., Kuno M. (1986) Effects of nerve growth factor on differentiation of muscle spindles following nerve lesion in neonatal rats. *J. Neurosci.* 6 (7), 2019–2025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-07-02019.1986>
- Sherrington C.S. (1907) On the proprioceptive system, especially in its reflex aspect. *Brain.* 29 (4), 467–482.
- Sigmundsson H., Haga M., Hopkins B. (2007) Sex differences in perception: exploring the integration of sensory information with respect to vision and proprioception. *Sex Roles.* 57, 181–186. <https://doi.org/10.1007/s11199-007-9228-y>
- Sonner M.J., Walters M.C., Ladle D.R. (2017) Analysis of proprioceptive sensory innervation of the mouse soleus: a whole-mount muscle approach. *PLoS ONE.* 12 (1), e0170751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170751>

- Taborowska M., Bukowska D., Drzymała-Celichowska H., Mierzejewska-Krzyżowska B., Celichowski J. (2016) Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius. *Somatosens. Mot. Res.* 33 (3–4), 200–208. <https://doi.org/10.1080/08990220.2016.1254609>
- Tiller N.B., Elliott-Sale K.J., Knechtle B., Wilson P.B., Roberts J.D., Millet G.Y. (2021) Do sex differences in physiology confer a female advantage in ultra-endurance sport? *Sports Med.* 51, 895–915. <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01417-2>
- Vafadar A.K., Côté J.N., Archambault P.S. (2015) Sex differences in the shoulder joint position sense acuity: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16, 273. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0731-y>
- Wu D., Schieren I., Qian Y., Zhang Ch., Jessell T.M., Nooij J.C. (2019) A role for sensory end organ-derived signals in regulating muscle spindle proprioceptor phenotype. *J. Neurosci.* 39 (22), 4252–4267. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2671-18.2019>
- Zeller-Plumhoff B., Roose T., Katsamenis O.L., Mavrogordato M.N., Torrens C., Schneider P., Hildebrandt G. (2017) Phase contrast synchrotron radiation computed tomography of muscle spindles in the mouse soleus muscle. *J. Anat.* 230 (6), 859–865. <https://doi.org/10.1111/joa.12606>

## **PODZIĘKOWANIA**

Dziękuję Panu Profesorowi Janowi Celichowskiemu oraz Pani Profesor Hannie Jackowiak, a także Pani Profesor Kindze Skiersz-Szewczyk za okazaną pomoc, życzliwość oraz cenne uwagi. Dziękuję również mężowi, rodzicom i rodzeństwu oraz współpracownikom za wsparcie.

## PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ – INFORMACJE DODATKOWE

### Pozostałe publikacje naukowe mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych)

Krutki P., Drzymała-Celichowska H., Bączyk M., Piotr M., Celichowski J. (2023) Differences in Ia proprioceptive input to spinal motoneurons between male and female rats. Eur. J. Neurosci. 58 (2), 2504–2514. <https://doi.org/10.1111/ejn.16053>

punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 3,698

Łochyński D., Pawlak M., Everaert I., Podgórski T., Gartych M., Borucka A.-M., Celichowski J., Derave W., Kaczmarek D. (2022) Motor unit fatigability following chronic carnosine supplementation in aged rats. Nutrients. 14 (3), 514. <https://doi.org/10.3390/nu14030514>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 5,719

Gartych M., Bukowska D. (2018) Biomarkery płynu mózgowo-rdzeniowego w chorobie Alzheimerera. Kosmos. 67 (4), 863–874.

punktacja MEiN: 40

## ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA

załącznik 6 do Wniosku o wszczęcie post.  
w sprawie nadania stopnia doktora

mgr Magdalena Piotr (*de domo* Gartych)  
Imię i nazwisko doktorantki

Poznań, 23.01.2025  
Miejscowość, data

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej o jej oryginalności, samodzielności jej przygotowania i o nienaruszeniu praw autorskich

Ja, niżej podpisana oświadczam, że:

- a) rozprawa doktorska pt. *Cechy morfometryczne oraz rozłożenie wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki samców i samic szczurów Wistar* jest wynikiem mojej działalności twórczej i powstała bez niedozwolonego udziału osób trzecich;
- b) wszystkie wykorzystane przeze mnie materiały źródłowe i opracowania zostały w niej wymienione, a napisana przez mnie praca nie narusza praw autorskich osób trzecich;
- c) załączona wersja elektroniczna pracy jest tożsama z wydrukiem rozprawy;
- d) praca nie była wcześniej podstawą nadania stopnia innej osobie.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego/karnego.

Magdalena Piotr  
Podpis doktorantki



mgr Magdalena Piotr (*de domo* Gartych)  
Imię i nazwisko doktorantki

Poznań, 23.01.2025  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt.

*Cechy morfometryczne oraz rozłożenie wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym  
łydki samców i samic szczurów Wistar*

polegał na:

pozyskaniu danych do prac badawczych, analizie preparatów mikroskopowych i zebranych danych, opracowaniu pierwszych wersji manuskryptów, wykonaniu rycin, udziale w analizie statystycznej danych, udziale w opracowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów, przygotowaniu i poprawieniu oraz zatwierdzeniu ostatecznej wersji autoreferatu.

*(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).*

  
Podpis doktorantki

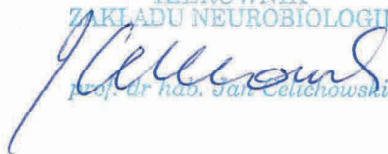
**Dotyczy wniosku o wszczęcie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych)**

### **Zadania promotora**

W przygotowaniu rozprawy doktorskiej pt: *Cechy morfometryczne oraz rozłożenie wrzecion mięśniowych w mięśniu przyśrodkowym brzuchatym łydki samców i samic szczurów Wistar*

mój udział polegał na:

zaprojektowaniu projektu badawczego i pozyskaniu finansowania na realizację badań, koordynacji projektu, udziale w pobieraniu materiału (mięśni), analizie i interpretacji wyników, przeglądach i korektach manuskryptów przedłożonych do publikacji, udziale w przygotowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów, poprawieniu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptów, nadzoru nad przygotowaniem autoreferatu.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU NEUROBIOLOGII  
  
prof. dr hab. Jan Celiński

mgr Magdalena Piotr (*de domo* Gartych)  
Katedra Nauk Biologicznych  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. E. Piaseckiego w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 5.02.2025  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

**Gartych M**, Jackowiak H, Bukowska D and Celichowski J. (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15:734555. doi: [10.3389/fnana.2021.734555](https://doi.org/10.3389/fnana.2021.734555)

polegał na:

przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, analizie preparatów mikroskopowych, identyfikacji wrzecion mięśniowych, wykonaniu pomiarów morfometrycznych, wykonaniu rycin, udziale w analizie statystycznej zebranych danych, udziale w przygotowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów oraz poprawieniu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.

(*Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej*).

  
.....  
Podpis współautora

Prof. dr hab. Hanna Jackowiak  
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt  
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 21.01.2025 rok  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Gartych M, **Jackowiak H**, Bukowska D and Celichowski J. (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15:734555. doi: [10.3389/fnana.2021.734555](https://doi.org/10.3389/fnana.2021.734555)

polegał na:

przygotowaniu przekroi histologicznych utrwalonych mięśni, przeglądzie manuskryptu przedłożonego do publikacji, poprawieniu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.

(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).

  
.....  
Podpis współautorki

emerytowany prof. AWF dr hab. Dorota Bukowska  
Imię i nazwisko

Poznań, 21.01.2025 rok  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Gartych M, Jackowiak H, **Bukowska D** and Celichowski J. (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15:734555. doi: 10.3389/fnana.2021.73455

polegał na:

przygotowaniu i utrwaleniu mięśni, przeglądzie manuskryptu przedłożonego do publikacji, poprawieniu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.

*(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).*

  
Podpis współautorki



Prof. dr hab. Jan Celichowski  
Katedra Nauk Biologicznych  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. E. Piaseckiego w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 5.02.2025  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Gartych M, Jackowiak H, Bukowska D and **Celichowski J.** (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15:734555. doi: 10.3389/fnana.2021.73455

polegał na:

zaprojektowaniu badań, udziale w pobieraniu materiału (mięśni), przeglądzie manuskryptu przedłożonego do publikacji, udział w przygotowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów, poprawieniu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji manuskryptu.

*(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).*

  
.....  
Podpis współautora



Mgr Magdalena Piotr (*de domo* Gartych)  
Katedra Nauk Biologicznych  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. E. Piaseckiego w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 5.02.2025  
Miejscowość, data

**Dotyczy:** postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

**Piotr M**, Skiersz-Szewczyk K, Jackowiak H, Celichowski J. (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Journal of Anatomy*. 243 (4): 658-663. (IF= 2.921, MEiN=140); doi: [10.1111/joa.13895](https://doi.org/10.1111/joa.13895)

polegał na:

pozyskaniu danych, analizie danych, opracowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, udziale w analizach statystycznych danych, udziale w opracowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów, zatwierdzeniu artykułu.

(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).

  
.....  
Podpis współautora

Dr hab. Kinga Skieresz-Szewczyk  
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt  
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 21.01.2025 rok  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Piotr M, **Skieresz-Szewczyk K**, Jackowiak H, Celichowski J. (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Journal of Anatomy*. 243 (4): 658-663. (IF= 2.921, MEiN=140); doi: [10.1111/joa.13895](https://doi.org/10.1111/joa.13895)

polegał na:

analizie danych, opracowaniu graficznym modelu 3D mięśnia, zatwierdzeniu artykułu.

(*Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej*).

  
Podpis współautorki

Prof. dr hab. Hanna Jackowiak  
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt  
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 21.01.2025 rok  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

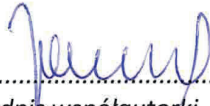
### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Piotr M, Skieresz-Szewczyk K, **Jackowiak H**, Celichowski J. (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Journal of Anatomy*. 243 (4): 658-663. (IF= 2.921, MEiN=140); doi: [10.1111/joa.13895](https://doi.org/10.1111/joa.13895)

polegał na: analizie danych, krytycznej weryfikacji manuskryptu, zatwierdzeniu artykułu.

(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).

  
.....  
Podpis współautorki

Prof. dr hab. Jan Celichowski  
Katedra Nauk Biologicznych  
Zakład Neurobiologii  
Akademia Wychowania Fizycznego  
im. E. Piaseckiego w Poznaniu  
Imię i nazwisko

Poznań, 5.02.2025  
Miejscowość, data

**Dotyczy: postępowania w sprawie nadania mgr Magdalenie Piotr (*de domo* Gartych) stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.**

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Piotr (*de domo* Gartych) zatytułowanej:

Piotr M, Skiersz-Szewczyk K, Jackowiak H, **Celichowski J.** (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Journal of Anatomy*. 243 (4): 658-663. (IF= 2.921, MEiN=140); doi: [10.1111/joa.13895](https://doi.org/10.1111/joa.13895)

polegał na:

zaprojektowaniu badań, krytycznej weryfikacji manuskryptu, udziału w opracowaniu odpowiedzi na pytania recenzentów, zatwierdzeniu artykułu.

*(Należy podać bardzo precyzyjnie opisany wkład merytoryczny w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej).*

  
.....  
Podpis współautora



# Evaluating Sexual Dimorphism of the Muscle Spindles and Intrafusal Muscle Fibers in the Medial Gastrocnemius of Male and Female Rats

Magdalena Gartych<sup>1\*</sup>, Hanna Jackowiak<sup>2</sup>, Dorota Bukowska<sup>1</sup> and Jan Celichowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurobiology, Poznań University of Physical Education, Poznań, Poland, <sup>2</sup> Department of Histology and Embryology, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Kevin A. Keay,  
The University of Sydney, Australia

### Reviewed by:

Chenglin Tang,  
Chongqing Medical University, China  
Jason Ivanusic,  
The University of Melbourne, Australia

### \*Correspondence:

Magdalena Gartych  
gartych@awf.poznan.pl

Received: 01 July 2021

Accepted: 14 September 2021

Published: 01 October 2021

### Citation:

Gartych M, Jackowiak H, Bukowska D and Celichowski J (2021) Evaluating Sexual Dimorphism of the Muscle Spindles and Intrafusal Muscle Fibers in the Medial Gastrocnemius of Male and Female Rats. *Front. Neuroanat.* 15:734555. doi: 10.3389/fnana.2021.734555

This study sought to investigate the sexual dimorphism of muscle spindles in rat medial gastrocnemius muscle. The muscles were cut transversely into 5–10 and 20  $\mu\text{m}$  thick serial sections and the number, density, and morphometric properties of the muscle spindles were determined. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the number of muscle spindles of male ( $14.45 \pm 2.77$ ) and female ( $15.00 \pm 3.13$ ) rats. Muscle mass was 38.89% higher in males (1.08 vs. 0.66 g in females), making the density of these receptors significantly higher ( $p < 0.01$ ) in females (approximately one spindle per 51.14 mg muscle mass vs. one per 79.91 mg in males). There were no significant differences between the morphometric properties of intrafusal muscle fibers or muscle spindles in male and female rats ( $p > 0.05$ ):  $5.16 \pm 2.43$  and  $5.37 \pm 2.27$   $\mu\text{m}$  for male and female intrafusal muscle fiber diameter, respectively;  $5.57 \pm 2.20$  and  $5.60 \pm 2.16$   $\mu\text{m}$  for male and female intrafusal muscle fiber number, respectively;  $25.85 \pm 10.04$  and  $25.30 \pm 9.96$   $\mu\text{m}$  for male and female shorter muscle spindle diameter, respectively; and  $48.99 \pm 20.73$  and  $43.97 \pm 16.96$   $\mu\text{m}$  for male and female longer muscle spindle diameter, respectively. These findings suggest that sexual dimorphism in the muscle spindles of rat medial gastrocnemius is limited to density, which contrasts previous findings reporting differences in extrafusal fibers diameter.

**Keywords:** sex differences, muscle spindles, motoneurons, density, morphometry

## INTRODUCTION

Muscle spindles are one of the most important proprioceptors in skeletal muscles, with afferent signals from these receptors functioning as excitatory input to motoneurons and enabling the control of body posture (Nielsen, 2002; Proske and Gandevia, 2009; Butler et al., 2017; Proske, 2019). The spindles are comprised of a bundle of 2–10 intrafusal muscle fibers aligned parallel to external muscle fibers and covered by a fusiform connective tissue capsule (Fitz-Ritson, 1982). The spindles are innervated by Ia and II afferent fibers and receive efferent innervation from  $\gamma$  and  $\beta$  motoneurons (Fitz-Ritson, 1982; Muramatsu et al., 2017; McComas et al., 2018). The afferent endings of muscle spindles are excited by muscle stretching and/or intrafusal muscle fiber contraction.



The medial gastrocnemius is a hindlimb muscle that is strongly activated during rapid movement and is essential for locomotion. This muscle type is expected to have a low muscle spindle density (Al-Mallak, 2006), while muscles with high muscle spindle density are generally involved in fine movements (Fitz-Ritson, 1982). Muscle spindle density and distribution vary across muscle type and mass (Kokkorogiannis, 2004; Banks, 2006; Zvaritch and MacLennan, 2015), different mammalian species (Scott and Young, 1987; Bredman et al., 1991; Lionikas et al., 2013), and age (Milburn, 1973; Winarakwong et al., 2004; Kim et al., 2007). Various methods can be used to determine the number and dimensions of the muscle spindles in muscle cross-sections (Patten and Ovalle, 1992; Eldred et al., 1998; Kierner et al., 1999), with the most efficient being Masson-Goldner trichrome dyeing for the visualization of connective tissue (Boyd-Clark et al., 2002).

Although several studies have investigated differences in the number and density of muscle spindles in rat skeletal muscles, the majority of this work involved only males (Kim et al., 2007; Elsohemy et al., 2009; Muramatsu et al., 2017) or did not distinguish between genders (Pang et al., 2014). To date, there has been no systematic investigation into potential differences in rat muscle spindle number, density, or morphometric properties across sexes. The muscle mass and the proportion of different muscle fiber types in rats are known to be dependent on the level of male hormones present during ontogeny (Bell, 2018). Recent studies have reported considerable sex-dependent differences in the muscle mass and diameter of extrafusal muscle fibers in rat medial gastrocnemius, suggesting differences in the morphometric properties of both intrafusal muscle fibers and muscle spindles (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2011; May et al., 2018). On the other hand, the staining of motoneurons in the motor nucleus of the medial gastrocnemius revealed that male rats had a greater number of  $\alpha$ -motoneurons than females, but a similar number of  $\gamma$ -motoneurons (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2014). This suggests that the number of muscle spindles in the medial gastrocnemius of male and female rats is similar and, therefore, the density of these receptors must be different. Building off these findings, this study sought to determine whether sexual dimorphism could be observed in rat medial gastrocnemius muscle by measuring the number, density, and morphometric properties of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Muscle Preparation

Experiments were performed on six male and six female 3-month-old Wistar rats. The mean body mass of the male and female rats was  $351.00 \pm 14.45$  and  $195.75 \pm 10.44$  g, respectively ( $p \leq 0.0001$ ). Animals were maintained in standard laboratory cages (two rats/cage; genders isolated) in a temperature- and humidity-controlled ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 10\%$ , respectively) animal house under a 12 h light/dark cycle. The rats were fed a standard laboratory diet *ad libitum* (Labofeed B, Poland) and had free access to tap water. Experiments were performed

in accordance with the European Union and Polish Law on Animal Protection and approved by the Local Bioethics Committee (Permission Number: 63/2017). All experimental protocols employed the 3Rs principles to minimize suffering and limit the number of animals used.

Animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (Morbital, 180 mg/kg, i.p.). The skin and part of the external muscles were removed from the left and right hind limbs of the animals. The preparations having the medial gastrocnemius muscles in the neutral length and attached to the foot and femur were preserved in 4% formalin solution for 7 days to fix the muscles in their normal shape. The fixed muscles were excised and weighed (without the Achilles tendon), giving a mean muscle mass of  $1.08 \pm 0.08$  and  $0.66 \pm 0.07$  g for male and female rats, respectively ( $p \leq 0.0001$ ). The muscles were then reimmersed in 4% formalin solution.

### Staining Procedure

After 3–5 days fixation in 10% neutral formalin, the muscle samples were dehydrated in an ethanol series (50–96%) and methyl benzoate and embedded in paraffin. The muscles were then cut transversely from the proximal to distal muscle attachment using a rotatory microtome Leica RM 2055 to give 5–10 and 20  $\mu\text{m}$  thick serial sections. Histoslides were then stained using the Masson-Goldner trichrome method to calculate the number of muscle spindles and determine/estimate their precise distribution in the muscles. Briefly, histological slices were first deparaffinized in xylene I–III for 5 min each, rehydrated in a descending alcohol series ( $2 \times 96\%$  alcohol for 3 min, 90% alcohol for 3 min, 80% alcohol for 3 min, and 70% alcohol for 3 min), and washed in distilled water for 5 min. The slices were then stained in Mayer's hematoxylin solution for 10–15 min, rinsed with warm tap water for 10 min, and washed in distilled water for 10 min. Sections were then stained in acidic-fuchsin solution for 10 min and washed in distilled water. The sections were differentiated in phosphomolybdic acid solution for 3 min, stained in aniline blue solution for 10 min, briefly rinsed in distilled water, and differentiated in 1% acetic acid solution for 1 min. The stained sections were dehydrated in ascending ethanol (washed in 70, 80% for 30 s, 90% for 5 min, and  $2 \times 96\%$  for 5 min) and toluene (I–III line for 5 min each) series and mounted using DPX medium.

### Muscle Spindle Measurements

The number and distribution of muscle spindles in the muscles were determined by light microscopy (Prolab, Poland). Morphometric analysis photographs of each muscle spindle were obtained on a Nikon Optihot-2 light microscope fitted with a Nikon DS-Fi1c camera (Tokyo, Japan), using  $10\times$  ( $0.38 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ),  $40\times$  ( $0.10 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ), and  $63\times$  ( $0.04 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ) zoom lenses. The morphometric traits of the spindles were measured in the equatorial muscle region using NIS-Elements Basic Research software (Nikon). The equatorial region was deemed a half-length of the muscle spindle. The muscle spindle diameter was calculated as the mean shorter and longer diameters. Only the shorter diameter of the intrafusal muscle fibers was used for comparing sex-related differences.



## Statistical Analysis

Data are reported as the mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Statistica v.13.0 software (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, United States). Significant differences between the sexes were evaluated using a Student's *t*-test for normally distributed data and also Student's *t*-test with independent variance estimation or a Mann–Whitney U test when a normal distribution could not be confirmed, with  $p < 0.05$  accepted as statistically significant.

## RESULTS

The body mass, muscle mass, number, density, and morphometry of medial gastrocnemius muscle spindles were obtained for both male and female Wistar rats (Table 1). Male rats had 44.2% greater body mass and 38.9% greater muscle mass than females. A total of 159 (11–19 receptors/muscle) and 180 (11–21 receptors/muscle) muscle spindles were identified across all examined male and female muscles, respectively. While the mean number of muscle spindles/muscle did not differ between males and females (Figure 1A), the density of spindles appeared to be different. In general, one muscle spindle was present per 79.91 and 51.14 mg of muscle mass in males and females, respectively ( $p < 0.01$ ).

Male and female muscle transversal sections containing muscle spindles were imaged (Figure 2). The morphometric properties of muscle spindles and intrafusal muscle fibers were compared between male and female muscles (a total of 825 and 968 intrafusal muscle fibers, respectively; Table 1). The intrafusal muscle fiber diameter and longer diameter of the muscle spindles were slightly greater in males (3.91 and 10.25%, respectively) than in females. However, there were no significant differences between intrafusal muscle fiber diameter, or the longer and shorter diameters of the muscle spindles in male and female muscles as well as the number of intrafusal muscle fibers per one receptor (Figure 1B). Notably, both male and female muscles had a range of 2–14 fibers/muscle spindle. Moreover, the total numbers of intrafusal muscle fibers in individual male and female muscles calculated as a sum of all intrafusal fibers in all identified muscle spindles in a given muscle were not different (Figure 1C).

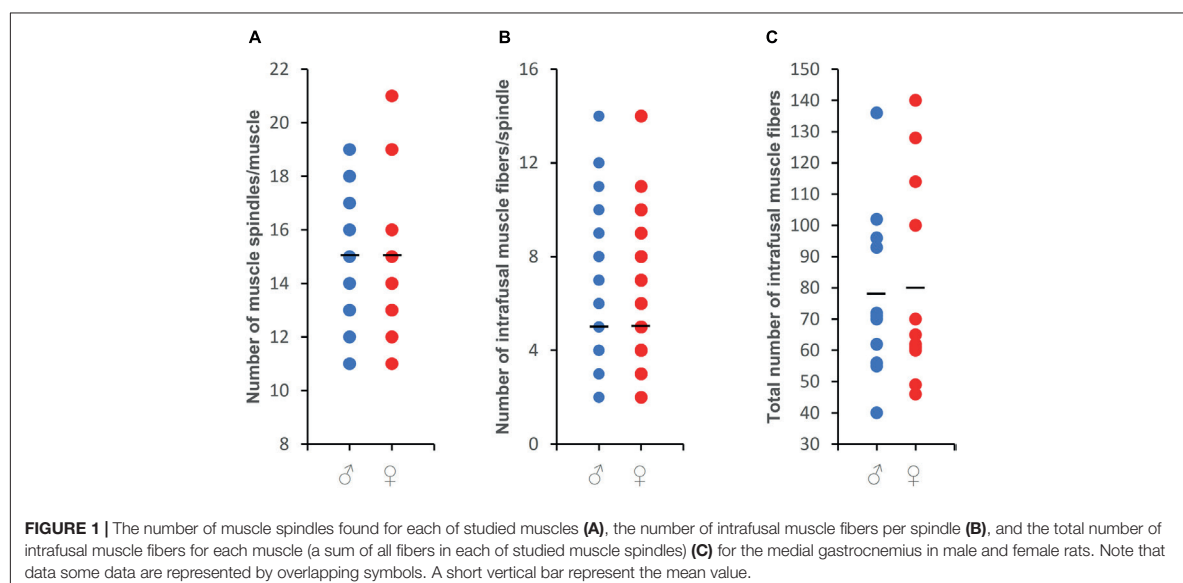
## DISCUSSION

There are limited studies characterizing sex-related differences in the muscle spindles of skeletal muscles. The sole report that considered sex investigated extraocular muscles and found significant differences between the total number of muscle spindles in male and female humans (269 vs. 217.5, respectively) (Lukas et al., 1994). The present study provides the first systematic investigation of sexual dimorphism in the muscle spindles of hindlimb skeletal muscle, focusing specifically on quantity, density, and morphometric properties. The number of muscle spindles in the muscles of male and female rats was similar; however, the density of these receptors was lower in males. This observation aligns with previous work, which found the number of  $\gamma$ -motoneurons innervating intrafusal muscle fibers to be similar between male and female rats (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2014). There were no sex-related differences in the number and diameter of intrafusal muscle fibers in muscle spindles, which contrasts a previous report that the extrafusal muscle diameter was 14% greater in males (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2011). Additionally, the total number of intrafusal muscle fibers in male and female muscles was similar, contrasting to about 1.5 times higher number of extrafusal muscle fibers in males (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2011). Male hormones influence the diameter of muscle fibers and play a major role in muscle mass (Eason et al., 2000; English and Schwartz, 2002). Therefore, the finding that intrafusal muscle fiber diameter is similar between the sexes suggests that male hormones have a limited influence on intrafusal muscle fibers. Importantly, Österlund et al. (2011) reported that muscle spindles reach maturity before the extrafusal fiber population in human masseter and biceps brachii muscles. In addition, the number of muscle spindles,  $\gamma$ -motoneurons innervating intrafusal muscle fibers, and intrafusal muscle fibers/receptor are similar in males and females. Based on these observations, it is likely that the motor innervation of muscle spindles and the number of muscle spindles and intrafusal muscle innervated by individual  $\gamma$ -motoneurons are not sexually dimorphic. This is in contrast to previously reported sex differences in the motor unit innervation ratio (the number of extrafusal muscle fibers innervated by one  $\alpha$ -motoneuron),

**TABLE 1 |** Mean  $\pm$  SD and range of body mass, muscle mass, number and density of muscle spindles, and morphometric properties of muscle spindles and intrafusal muscle fibers for male ( $\sigma$ ) and female ( $\varphi$ ) rats.

| Sex       | Body mass <sup>a</sup><br>(g) | Muscle mass <sup>a</sup><br>(g) | Number of<br>muscle<br>spindles <sup>a</sup> | Muscle<br>spindle<br>density <sup>b</sup> (mg) | Number of<br>intrafusal<br>fibers/<br>spindle <sup>c</sup> | Shorter<br>diameter of<br>intrafusal<br>fibers <sup>c</sup> ( $\mu$ m) | Shorter<br>diameter of<br>muscle<br>spindles <sup>c</sup> ( $\mu$ m) | Longer<br>diameter of<br>muscle<br>spindles <sup>c</sup> ( $\mu$ m) | The total number<br>of intrafusal<br>muscle fibers per<br>muscle <sup>a</sup> |
|-----------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| $\sigma$  | 351.00 $\pm$ 14.45<br>232–366 | 1.08 $\pm$ 0.08<br>0.95–1.20    | 14.45 $\pm$ 2.77<br>11–19                    | 79.91 $\pm$ 15.56<br>59.74–92.31               | 5.57 $\pm$ 2.20<br>2–14                                    | 5.16 $\pm$ 2.43<br>0.67–14.09                                          | 25.85 $\pm$ 10.14<br>9.15–55.69                                      | 48.99 $\pm$ 20.73<br>17.71–112.85                                   | 77.55 $\pm$ 27.11<br>40–136                                                   |
| $\varphi$ | 195.75 $\pm$ 10.44<br>185–207 | 0.66 $\pm$ 0.07<br>0.57–0.74    | 15.00 $\pm$ 3.13<br>11–21                    | 51.14 $\pm$ 9.08<br>40.71–66.36                | 5.60 $\pm$ 2.16<br>2–14                                    | 5.37 $\pm$ 2.27<br>1.33–14.44                                          | 25.30 $\pm$ 9.96<br>9.08–56.68                                       | 43.97 $\pm$ 16.96<br>15.29–109.78                                   | 79.67 $\pm$ 32.12<br>46–140                                                   |
| <i>p</i>  | **                            | **                              | NS                                           | *                                              | NS                                                         | NS                                                                     | NS                                                                   | NS                                                                  | NS                                                                            |

Significant differences across sexes were analyzed using a <sup>a</sup>Student's *t*-test, <sup>b</sup>Student's *t*-test with independent variance estimation, or <sup>c</sup>Mann–Whitney U test. NS, non-significant ( $p > 0.05$ ), \* $p < 0.01$ , and \*\* $p < 0.001$ .



which was 26% higher in male rat medial gastrocnemius muscle (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2011).

The number of muscle spindles identified in rat medial gastrocnemius was consistent with previous work performed using male rats. Kim et al. (2007) measured the number of muscle spindles in the medial gastrocnemius muscles of male Fischer rats and reported 11–12 and 11–15 spindles in rats aged 6.5 and 29.5 months, respectively. Muramatsu et al. (2017) reported  $15.6 \pm 2.3$  and  $16.3 \pm 1.3$  receptors in the medial gastrocnemius of 3-month-old and 5.5-month-old male Wistar rats, respectively. The average number of muscle spindles reported in 8-month-old male Fischer 344 rats was  $16.7 \pm 0.96$  (Asano et al., 2019). Several studies have reported the number of muscle spindles in gastrocnemius muscles (including the medial and lateral head). Elsohemy et al. (2009) found  $23.67 \pm 2.52$  spindles in adult Lewis rats. Pang et al. (2014) measured  $26.7 \pm 2.5$  muscle spindles in 9-week-old Sprague-Dawley rats, although they did not distinguish between male and female. These observations additionally suggest that the two heads of the gastrocnemius muscle contain similar numbers of muscle spindles.

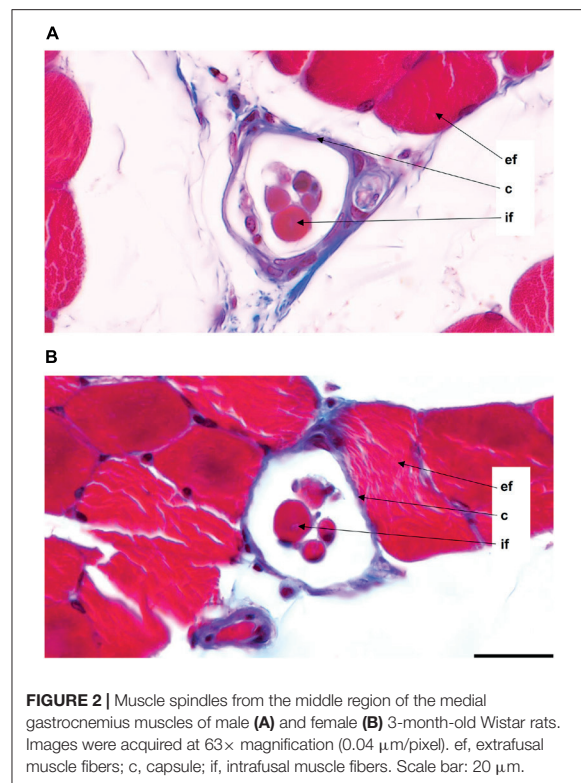
Several methods can be used to calculate the density of muscle spindles, the most popular being to divide the total number of spindles by the wet weight of the muscle. In this study, significant differences were observed in the muscle spindle density of male and female rats. The density of muscle spindles is likely relevant to the function of the skeletal muscles, particularly the ability to perform rapid or fine movements (Fitz-Ritson, 1982). Furthermore, the density of muscle spindles may differ for various muscles. For example, the density of muscle spindles in human longus colli and multifidus muscles were estimated to be 48.6 and 24.3/g, respectively (Boyd-Clark et al., 2002). Although this work was performed on ten men and six women, the authors did not analyze the data for sex differences. The muscle spindle density in the gastrocnemius muscle of rats reported in this work

differs from that of Al-Mallak (2006), who found 5.78 muscle spindles per 1 g of muscle mass in adult rats. Banks (2006) systematically reviewed the density of muscle spindles in the gastrocnemius muscle of rats, cats, and humans and reported values of 40.3, 6.5, and 0.40 spindles per 1 g of muscle mass, respectively. Neither the Al-Mallak (2006) nor the Banks (2006) study indicated the sex of the animals.

The number of intrafusal muscle fibers varies greatly by species and muscle type; for example, 2–12 intrafusal muscle fibers are observed in human male extraocular muscle (Bruenech and Ruskell, 2001) while 1–16 are found in female bovine extraocular muscle (Maier, 2000). The number of fibers/muscle spindle measured in this study (2–14) is within this range and agrees with previous work investigating rat muscles. For example, the masticatory muscles of adult Sprague-Dawley rats of both sexes are reported to have 2–5 intrafusal muscle fibers (Lennartsson, 1980). Muramatsu et al. (2017) found  $4.3 \pm 0.8$  and  $4.3 \pm 0.7$  intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of 3-month-old and 5.5-month-old male rats, respectively.

No studies have investigated sex-related differences in the diameter of rat intrafusal muscle fibers. This work found the intrafusal fiber diameter in rat medial gastrocnemius muscles to be similar across the sexes (1–14  $\mu\text{m}$ ), which is within the range of diameters reported for mammalian muscles (e.g., 2–20  $\mu\text{m}$  for human levator palpebrae superioris muscle) (Korzeniowska-Kromer and Wójtowicz-Kaczmarek, 2003). Muramatsu et al. (2017) reported the average cross-sectional area of intrafusal muscle fibers to be  $41.5 \pm 11.5 \mu\text{m}^2$  in 3-month-old male Wistar rats.

The longer diameter of the muscle spindles for males amounted to  $48.99 \pm 20.73 \mu\text{m}$  and for females ( $43.97 \pm 16.96 \mu\text{m}$ ). These measurements are consistent with the  $42.29 \pm 3.04 \mu\text{m}$  maximal diameter of muscle spindles in the gastrocnemius muscles of adult Lewis



rats (Elsohemy et al., 2009). Pang et al. (2014) reported a  $42.9 \pm 5.5$  μm diameter of muscle spindles in the medial gastrocnemius muscles of 9-week-old male and female Sprague-Dawley rats, while Sekiya et al. (1986) noted a range of 15–85 μm in Wistar rats 25–35 days after birth.

While male and female muscle spindles share similar morphometric properties, their density differs significantly. This observation could explain some functional differences associated with proprioceptive feedback from muscle receptors in humans. For example, women obtained better results than men in right-handed intra-modal matching tasks, suggesting greater congruency in visual and proprioceptive spaces (Sigmundsson et al., 2007). This could be associated with women's more precise fine hand movement; e.g., more legible writing (Hartley, 1991). Interestingly, a study on the role of sex hormones in handwriting style found that women's right-hand digit ratio correlated with the relative sexuality of their handwriting, but there was no corresponding relationship for men (Beech and Mackintosh, 2005). The lower density of muscle spindles in men might explain their decreased shoulder joint position sense acuity reported by Vafadar et al. (2015). Moreover, the muscle spindles in females probably have a better chance of functional recovery following the nerve damage as their receptors have higher density and their muscles are smaller (Elsohemy et al., 2009).

The study has some limitations concerning unexplored sex related differences in the studied muscle although additional

experiments may answer these question. First, the structure of primary and secondary endings (of Ia and II sensory fibers) in muscle spindles was not analyzed. The quantity and distribution of Ia and II afferent sensory fibers may be defined with immunohistochemical markers like Parvalbumin or Runx3 and molecular markers specific to muscle spindles afferent sensory fibers like *Heg* and *Inhbb* (Wu et al., 2019). The identification of muscle fibers afferent subtypes may also be done with morphological methods based on confocal microscopy and also immunohistochemistry analysis (Sonner et al., 2017). Second, the distribution of muscle spindles and their relation to two compartments of medial gastrocnemius muscle are still unknown. The muscle compartments may be marked with the glycogen depletion technique (Taborowska et al., 2016). Third, the bag and chain intrafusal fibers in muscle spindles were not identified and differentiated.

## CONCLUSION

Overall, this study found that only the density of muscle spindles differed in male and female rat medial gastrocnemius, in contrast to previously reported differences in the number and diameter of extrafusal muscle fibers.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Local Bioethics Committee in Poznań (Permission Number: 63/2017).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JC conceived and designed the research and conducted the data interpretation. MG wrote first draft of the manuscript. MG, HJ, DB, and JC collected and analyzed the data. HJ, DB, and JC reviewed the manuscript submitted for publication. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by the National Science Centre (Grant No. 2018/31/B/NZ7/01028).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Katarzyna Jackowiak from the Department of Histology and Embryology of Poznań University of Life Sciences for her excellent technical assistance.

## REFERENCES

- Al-Mallak, M. K. (2006). Histological study on neuromuscular receptors of rat skeletal muscles. *Bas. J. Vet. Res.* 5, 44–56.
- Asano, K., Nakano, T., Tokutake, K., Ishii, H., Nishizuka, T., Iwatsuki, K., et al. (2019). Muscle spindle reinnervation using transplanted embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve transection in rats. *Cell Prolifer.* 52:e12660. doi: 10.1111/cpr.12660
- Banks, R. W. (2006). An allometric analysis of the number of muscle spindles in mammalian skeletal muscles. *J. Anat.* 208, 753–768. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00558.x
- Beech, J. R., and Mackintosh, I. C. (2005). Do differences in sex hormones affect handwriting style? Evidence from digit ratio and sex role identity as determinants of the sex of handwriting. *Pers. Individ. Differ.* 39, 459–468. doi: 10.1016/j.paid.2005.01.024
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology* 159, 2596–2613. doi: 10.1210/en.2018-00220
- Boyd-Clark, L. C., Briggs, C. A., and Galea, M. P. (2002). Muscle spindle distribution, morphology, and density in longus colli and multifidus muscles of the cervical spine. *Spine* 27, 694–701. doi: 10.1097/00007632-200204010-00005
- Bredman, J. J., Weijss, W. A., and Brugman, P. (1991). relationships between spindle density, muscle architecture and fibre type composition in different parts of the rabbit masseter. *Eur. J. Morphol.* 29, 297–307.
- Bruenech, J. R., and Ruskell, G. L. (2001). Muscle spindles in extraocular muscles of human infants. *Cells Tissues Organs*. 169, 388–394. doi: 10.1159/000047906
- Butler, A. A., Héroux, M. E., and Gandevia, S. C. (2017). Body ownership and a new proprioceptive role for muscle spindles. *Acta Physiol.* 220, 19–27. doi: 10.1111/apha.12792
- Eason, J. M., Schwartz, G., Shirley, K. A., and English, A. W. (2000). Investigation of sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle showing different effects of androgen deprivation in adult and young adult animals. *Arch. Oral Biol.* 45, 683–690. doi: 10.1016/s0003-9969(00)00030-3
- Eldred, E., Yung, L., Eldred, D., and Roy, R. R. (1998). Distribution of muscle spindles in a simply structured muscle: integrated total sensory representation. *Anat. Rec.* 251, 161–172.
- Elsohemy, A., Butler, R., Bain, J. R., and Fahnestock, M. (2009). Sensory protection of rat muscle spindles following peripheral nerve injury and reinnervation. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 1860–1868. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181bcee47
- English, A. W., and Schwartz, G. (2002). Development of sex differences in the rabbit masseter is not restricted to a critical period. *J. Appl. Physiol.* 92, 1214–1222. doi: 10.1152/japplphysiol.00953.2001
- Fitz-Ritson, D. (1982). The anatomy and physiology of the muscle spindle, and its role in posture and movement: a review. *J. Can. Chiropr. Assoc.* 26, 144–150.
- Hartley, J. (1991). Sex differences in handwriting: a comment on spear. *Br. Educ. Res. J.* 17, 141–145. doi: 10.1080/0141192910170204
- Kierner, A. C., Zelenka, I., Lukas, J. R., Aigner, M., and Mayr, R. (1999). Observations on the number, distribution and morphological peculiarities of muscle spindles in the tensor tympani and stapedius muscle of man. *Hear. Res.* 135, 71–77. doi: 10.1016/s0378-5955(99)00092-1
- Kim, G. H., Suzuki, S., and Kanda, K. (2007). Age-related physiological and morphological changes of muscle spindles in rats. *J. Physiol.* 582, 525–538. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130120
- Kokkorogiannis, T. (2004). Somatic and intramuscular distribution of muscle spindles and their relation to muscular angiotypes. *J. Theor. Biol.* 229, 263–280. doi: 10.1016/j.jtbi.2004.03.019
- Korzeniowska-Kromer, E., and Wójtowicz-Kaczmarek, K. (2003). Muscle spindles in the levator palpebrae superioris muscle of human fetuses. *Folia Morphol.* 62, 289–290.
- Lennartsson, B. (1980). Number and distribution of muscle spindles in the masticatory muscles of the rat. *J. Anat.* 130, 279–288.
- Lionikas, A., Smith, C. J., Smith, T. L., Bünger, L., Banks, R. W., and Bewick, G. S. (2013). Analyses of muscle spindles in the soleus of six inbred mouse strains. *J. Anat.* 223, 289–296. doi: 10.1111/joa.12076
- Lukas, J. R., Aigner, M., Blumer, R., Heinzl, H., and Mayr, R. (1994). Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 4317–4327.
- Maier, A. (2000). Morphological variability and specializations in bovine extraocular muscle spindles. *Ann. Anat.* 182, 259–267. doi: 10.1016/S0940-9602(00)80031-X
- May, A., Bramke, S., Funk, R. H. W., and May, C. A. (2018). The human platysma contains numerous muscle spindles. *J. Anat.* 232, 146–151. doi: 10.1111/joa.12724
- McComas, A., deBruin, H., and Fu, W. (2018). quantitative input-output relationships between human soleus muscle spindle afferents and motoneurons. *J. Neurophysiol.* 119, 887–893. doi: 10.1152/jn.00273.2017
- Mierzejewska-Krzyżowska, B., Bukowska, D., Taborowska, M., and Celichowski, J. (2014). Sex differences in the number and size of motoneurons innervating rat medial gastrocnemius muscle. *Anat. Histol. Embryol.* 43, 182–189. doi: 10.1111/ah.12060
- Mierzejewska-Krzyżowska, B., Drzymała-Celichowska, H., and Celichowski, J. (2011). Gender differences in the morphometric properties of muscle fibres and the innervation ratio of motor units in rat medial gastrocnemius muscle. *Anat. Histol. Embryol.* 40, 249–255. doi: 10.1111/j.1439-0264.2011.01066.x
- Milburn, A. (1973). The early development of muscle spindles in the rat. *J. Cell. Sci.* 12, 175–195.
- Muramatsu, K., Niwa, M., Tamaki, T., Ikutomo, M., Masu, Y., Hasegawa, T., et al. (2017). Effect of streptozotocin-induced diabetes on motoneurons and muscle spindles in rats. *Neurosci. Res.* 115, 21–28. doi: 10.1016/j.neures.2016.10.004
- Nielsen, B. G. (2002). The role of muscle spindles in constraining motor control. *Neurocomputing* 44–46, 943–949. doi: 10.1016/S0925-2312(02)00495-2
- Österlund, C., Liu, J.-X., Thornell, L.-E., and Eriksson, P.-O. (2011). Muscle spindle composition and distribution in human young masseter and biceps brachii muscles reveal early growth and maturation. *Muscle Biol.* 294, 683–693. doi: 10.1002/ar.21347
- Pang, Y., Hong, Q., and Zheng, J. (2014). Sensory reinnervation of muscle spindles after repair of tibial nerve defects using autogenous vein grafts. *Neural Regen. Res.* 9, 610–615. doi: 10.4103/1673-5374.130103
- Patten, R. M., and Ovalle, W. K. (1992). Morphometry and histochemistry of the hamster tenuissimus and its muscle spindles. *Anat. Rec.* 232, 499–511. doi: 10.1002/ar.1092320407
- Proske, U. (2019). Exercise, fatigue and proprioception: a retrospective. *Exp. Brain Res.* 237, 2447–2459. doi: 10.1007/s00221-019-05634-8
- Proske, U., and Gandevia, S. C. (2009). The kinaesthetic senses. *J. Physiol.* 587, 4139–4146. doi: 10.1113/jphysiol.2009.175372
- Scott, J. J., and Young, H. (1987). The number and distribution of muscle spindles and tendon organs in the peroneal muscles of the Cat. *J. Anat.* 151, 143–155.
- Sekiya, S., Homma, S., Miyata, Y., and Kuno, M. (1986). Effects of nerve growth factor on differentiation of muscle spindles following nerve lesion in neonatal rats. *J. Neurosci.* 6, 2019–2025. doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-07-02019.1986
- Sigmundsson, H., Haga, M., and Hopkins, B. (2007). Sex differences in perception: exploring the integration of sensory information with respect to vision and proprioception. *Sex Roles* 57, 181–186. doi: 10.1007/s11199-007-9228-y
- Sonner, M. J., Walters, M. C., and Ladle, D. R. (2017). Analysis of proprioceptive sensory innervation of the mouse soleus: a whole-mount muscle approach. *PLoS One* 12:e0170751. doi: 10.1371/journal.pone.0170751
- Taborowska, M., Bukowska, D., Drzymała-Celichowska, H., Mierzejewska-Krzyżowska, B., and Celichowski, J. (2016). Morphometric properties and innervation of muscle compartments in rat medial gastrocnemius.

- Somatosens. Mot. Res.* 33, 200–208. doi: 10.1080/08990220.2016.1254609
- Vafadar, A. K., Côté, J. N., and Archambault, P. S. (2015). Sex differences in the shoulder joint position sense acuity: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16:273. doi: 10.1186/s12891-015-0731-y
- Winarakwong, L., Muramoto, T., Soma, K., and Takano, Y. (2004). Age-related changes and the possible adaptability of rat jaw muscle spindles: immunohistochemical and fine structural studies. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 227–240. doi: 10.1679/aohc.67.227
- Wu, D., Schieren, I., Qian, Y., Zhang, Ch, Jessell, T. M., and Nooij, J. C. (2019). A role for sensory end organ-derived signals in regulating muscle spindle proprioceptor phenotype. *J. Neurosci.* 39, 4252–4267. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2671-18.2019
- Zvaritch, E., and MacLennan, D. H. (2015). Muscle spindles exhibit core lesions and extensive degeneration of intrafusal fibers in the Ryr1<sup>L4895T/wt</sup> mouse model of core myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 34–39. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.056
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2021 Gartych, Jackowiak, Bukowska and Celichowski. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats

M. Piotr<sup>1</sup> | K. Skiersz-Szewczyk<sup>2</sup> | H. Jackowiak<sup>2</sup> | J. Celichowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

## Correspondence

M. Piotr, Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, Poznan, Poland.

Email: [gartych@awf.poznan.pl](mailto:gartych@awf.poznan.pl)

## Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award Number: 2018/31/B/NZ7/01028

## Abstract

The spatial distribution of the medial gastrocnemius muscle spindles of 10 male and 10 female rats was analysed under a light microscope, and for the first time, visualised using a 3D model of the muscle. Serial cross-sections of the medial gastrocnemius muscles were separated into 10 divisions along with the proximo-distal axis. The muscle spindles of the rat medial gastrocnemius were predominantly distributed on the proximo-medial divisions of the muscle. There were no sex-related differences in the distribution of the studied receptors. A single division contained an average of 2.71 receptors for animals of both sexes. Moreover, the calculated lengths of male and female rat muscle spindles were comparable, and average lengths did not significantly differ ( $3.30 \pm 1.47$  mm for male and  $3.26 \pm 1.32$  mm for female rats). Therefore, the present results fill gaps in recent observations concerning similarities in muscle spindle numbers between male and female animals, despite significant differences in muscle mass and size.

## KEYWORDS

3D reconstruction, dimorphism, morphology, skeletal muscle

## 1 | INTRODUCTION

Muscle spindles are crucial for the control of body position and movement. The distribution of these spindles has been investigated in numerous studies, which have indicated that the distribution was not homogeneous and differed among various mammalian muscles (Barker & Chin, 1960; Bredman et al., 1991; Eldred et al., 1998; Kokkorigiannis, 2004; Ovalle et al., 1999; Scott & Young, 1987). Regarding the sheep multifidus muscle, James et al. (2022) confirmed that the majority of muscle spindles were distributed in the middle portions of the muscle belly. In a similar study, Lian et al. (2022) measured the relative distance from muscle spindles to nerve entry points for four limb muscles of C57BL/6 female mice,

and a 2D distribution of the muscle spindles was presented for a sample muscle. In addition, the heterogenic distribution of muscle spindles was shown for the chosen cross-sections (Lian et al., 2022). Zeller-Plumhoff et al. (2017) documented that muscle spindles in the solei of male mice were concentrated in the middle portion of these muscles and were presented using a one-axis layout. A recent study identified considerable differences in the density of gastrocnemius muscle spindles between male and female rats, with a 39% higher muscle mass shown in males compared to females (Gartych et al., 2021). However, there were no sex differences in the number of muscle spindles, the size of the muscle spindles or the number and diameter of the intrafusal muscle fibres. The spatial distribution of muscle spindles, as well as their lengths, have not been analysed

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Anatomy* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Anatomical Society.



in this study. Although the body mass, central nervous system and muscle mass are considerably greater in male rats than in females (Gartych et al., 2021), no studies have been identified which compared sex-related differences in the distribution of these receptors in hindlimb muscles. Currently, 3D visualisation is not used in neuro-anatomy to illustrate the distribution of spindles in the muscle, and the distribution of these structures has only been demonstrated on a 2D plane or a single axis.

The mass, size and architecture of a skeletal muscle differ considerably depending on sex. The extrafusal muscle fibres of the medial gastrocnemius muscle have a greater diameter in male rats than in female rats (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2014). Furthermore, male rats have a larger pennation angle of the medial gastrocnemius than that of females (34.6° vs. 27.3°, respectively) (Manal et al., 2006; Takahashi et al., 2022). Additionally, Chow et al. (2000) found that the length of muscle fibres was greater in male individuals than in females. However, the determination of whether these differences in muscle architecture are related to the length of the muscle spindles (measured as the length of intrafusal fibres) has not been documented, although literature data indicate that the length of muscle spindles for different muscles of certain species varies considerably, with a range of 0.14 to 5.40 mm (Barker & Chin, 1960; Eldred et al., 1998; Kierner et al., 1999; May et al., 2018). This study aimed to present and compare the distribution and length of muscle spindles in the medial gastrocnemius of male and female rats. For this purpose, the 3D reconstruction technique was used for the first time to graphically present the muscle spindle distribution. The obtained results will contribute to the knowledge concerning sex differences in the sensory innervation of skeletal muscles.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

The animal characteristics, muscle preparation method and staining procedure for standard histological transverse cross-sections along with the long axis of 10 male and 10 female rat medial gastrocnemius muscles described by Gartych et al. (2021) were used in this study.

The number of muscle cross-sections used was determined and the muscle was then divided into 10 proportional divisions, numbered 1–10, along with the proximo-distal axis (Figure 1). One division included 170–260 cross-sections in males and 130–260 cross-sections in females. The presence of muscle spindles on the serial muscle cross-sections was determined using a light microscope (Prolab, Poland). The beginning and end of each muscle spindle were marked and all cross-sections were proportionally distributed into 10 divisions. The length of the muscle spindle (the length of the longest intrafusal muscle fibre) was determined, and the distribution of individual muscle spindles along with the 10 divisions of the medial gastrocnemius muscle of male and female rats was obtained. Additionally, the medio-lateral position of each spindle within the muscle was determined. Magnifications of 10× (0.38 µm/pixel) and 63× (0.04 µm/pixel) were used for the muscle spindle photographs.

To perform 3D reconstruction and observation of one entire male medial gastrocnemius muscle with muscle spindles, serial cross-sections were observed and photographed in a single line under a magnification of ×1.25 using an Axioskop 2 Plus light microscope (Zeiss) with a Progress Gryphax Microscope Camera (Jenoptik). The 1934 images were separated into 10 divisions with an average of 200 images for each. The following steps were used to create the 3D reconstruction: (1) conversion to a single channel (green channel), (2) alignment, (3) recalculation into uniform coordinates (necessary for the next step—segmentation), (4) segmentation, (5) resampling in the X, Y and Z directions (the resampling was necessary to reduce the resolution of the stack to speed up the calculation of the surface; additionally, resampling in the Z-direction smoothens the surface image) and (6) surface generation using the professional computer software, Amira (Thermo Fisher Scientific, ver. 2020) (Movie 1). Based on the 3D reconstruction, an animation showing the 3D structure of the muscle and muscle spindles in the Z and Y axes was prepared using the Animation Director tool in the Amira software. In this 3D reconstruction, the muscle is transparent and the muscle spindles are highlighted in green.

Statistical analysis was performed using Statistica v.13.0 software (TIBCO Software Inc.). Quantitative parameters were studied

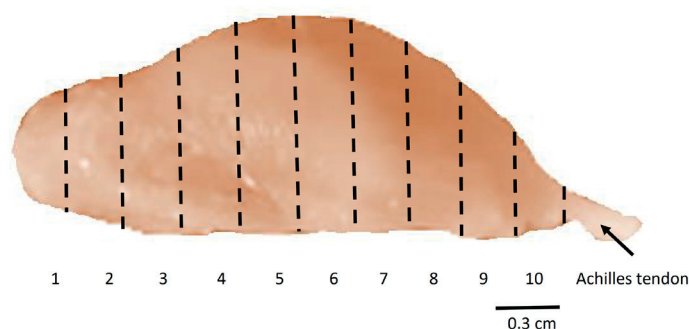


FIGURE 1 Macrophotograph of the fixed right medial gastrocnemius muscle of a male rat (outer surface) and distribution of 10 divisions along with the proximo-distal axis.

and data were plotted on graphs using the mean and standard deviation (SD), which were grouped by sex and muscle section. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the distribution, and Levene's test was used to test the homogeneity of the variance. To analyse the sex differences for variables that met the condition of normality and homogeneity of variance, a Student's *t*-test (*t*) was performed. In situations where at least one variable of the parameter pair did not meet the condition of normality or homogeneity of variance, the *U*-Mann-Whitney test was used (*Z*). An analysis of variance for multivariate systems (*F*) was used to examine length differences of muscle spindles between muscle parts in males and those in females. Significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3 | RESULTS

The 10 analysed medial gastrocnemius muscles revealed 148 muscle spindles for males and 152 for females. The cross-sections of the muscle spindles showing intrafusal muscles surrounded by capsules in male and female medial gastrocnemius muscles are presented in Figure 2.

A schematic localisation of the muscle spindles of the two studied muscles (one male and one female, as seen from the antero-posterior projection plan) is shown in Figure 3. The muscle spindles were predominantly distributed in the widest part of the muscle, which was located in divisions 4–6 for both male and female specimens (Figures 3 and 4a,b, Movies 2 and 3). The proximal part of the medial gastrocnemius muscles was characterised by a higher number of muscle spindles than those in the most distal part of the muscle, where divisions 9 and 10 lacked these spindles (Figures 3 and 4a,b, Movies 2 and 3). The distribution along with the proximo-distal axis of the muscle for males and females was normal and spindles were located along with the longitudinal axis of the medial gastrocnemius muscle (Figure 3, Movies 2 and 3). The average number of muscle spindles per division amounted to  $2.71 \pm 1.81$  for males and  $2.71 \pm 1.95$  for females (the difference was non-significant:  $t = 0.00$ ;  $p = 1.00$ ). Moreover, the distribution of muscle spindles for all successive divisions did not differ when data for male and female muscles were compared ( $p > 0.05$  for all divisions). The average location of the muscle spindles along with the muscle was calculated based on the distribution of spindles in all serial divisions and was determined as the 5th division (the average values were 4.40 for males and 4.18 for females).

The lengths of the spindles were similar for male and female muscles (0.78–7.41 mm in males and 0.68–6.54 mm in females; Figure 4c,d), and the mean lengths amounted to  $3.30 \pm 1.47$  mm for male rats and  $3.26 \pm 1.32$  mm for female rats (the difference was non-significant,  $Z = 0.05$ ;  $p = 0.96$ ).

Figure 4e,f presents the length of muscle spindles in 10 muscle divisions. For this analysis, the middle point of each muscle spindle was assigned to the respective division. The plot presents the mean values and standard deviations of muscle spindle lengths belonging to the serial divisions (the length of muscle spindle in serial divisions

as well as sex differences in the distribution were non-significant,  $F(8,283) = 1.90$ ;  $p = 0.059$ ).

### 4 | DISCUSSION

Recently, it was demonstrated that there is a lack of sex-related differences in the number of muscle spindles in the rat medial gastrocnemius, despite a significant difference in muscle mass (Gartych et al., 2021). In the present paper, we verified that there were no differences in the distribution or length of muscle spindles between male and female rats, despite the evident differences in muscle mass and size. These observations broaden the knowledge of sex differences in skeletal muscle structure and innervation.

Muscle spindles have been studied in numerous muscles with variable functions and structure and considerable variability in

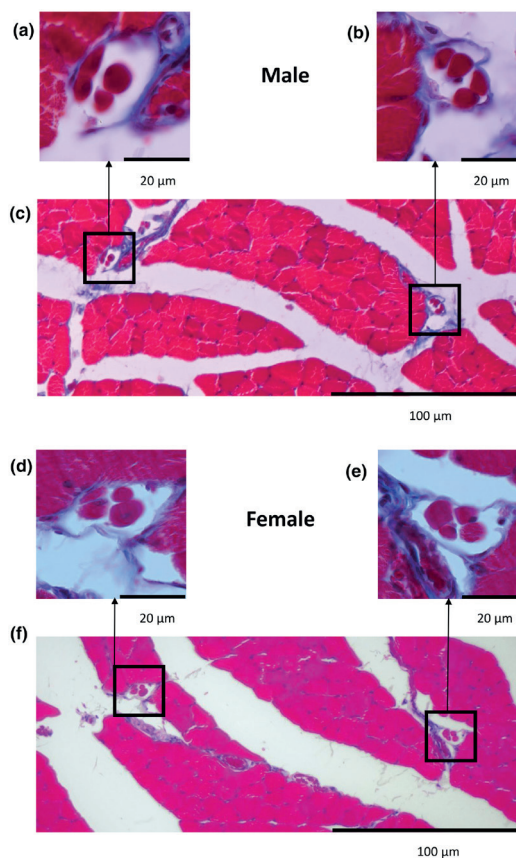
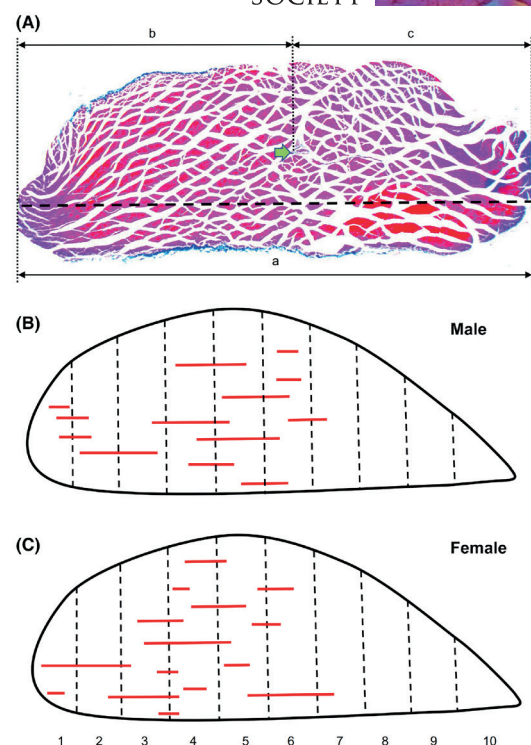


FIGURE 2 Microphotographs of male (upper panel—a–c) and female (lower panel—d–f) cross-sections of the middle part of the medial gastrocnemius muscle. For each of the two presented muscle fragments, the higher magnification of two muscle spindles are visible.



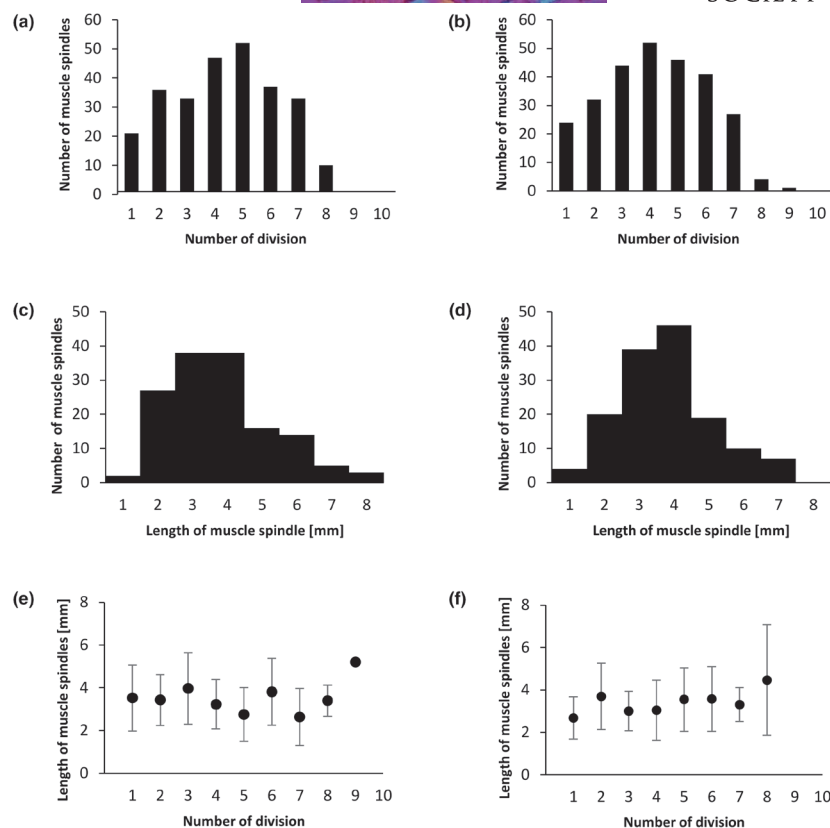
**FIGURE 3** Distribution of muscle spindles on the horizontal sectional plane of the rat medial gastrocnemius. (A) Photograph of a sample cross-section of the female medial gastrocnemius with one muscle spindle indicated by the green arrow, which illustrates the method of positioning the studied receptor. The position of each muscle spindle on the muscle width axis (a) was determined using the distance to the borders (b, c). Additionally, the position of each muscle spindle along with the muscle and the distribution within 10 divisions was determined basing on number of muscle cross-sections showing visible muscle spindles. (B, C) Distribution of 13 and 15 muscle spindles on a horizontal division plane for a left male and left female muscle, respectively. The scheme assumes that muscle spindles are located along with the longitudinal axis of the muscle.

their distribution has been reported. For example, in spinal stabilisers, multifidus muscles from merino sheep muscle spindles were shown to occur predominantly in the central part of this muscle (James et al., 2022). In contrast, human digastric muscle spindles were present in the anterior belly (Saverino et al., 2014), whereas in the quadrilateral masseter of male rabbits, muscle spindles occurred near the middle and anterior parts of the muscle, and there was a descending trend in the localisation of the spindles towards the insertion of the muscle (Bredman et al., 1991). Relatively consistent observations have been noted regarding hindlimb muscles. Barker and Chin (1960) found that the majority of muscle spindles were located in the proximal half of two limb muscles of cats, the rectus femoris (part of the quadriceps muscle responsible for knee

extension/hip flexion) and the fifth interosseus (responsible for finger adduction and abduction). Similarly, studies of these receptors in cat hindlimb muscles have indicated that in the peroneus tertius (crucial for eversion of the foot) and peroneus longus (plantar flexor of the foot and recurrent foot), muscle spindles were located mainly in proximal regions (Scott & Young, 1987). The current results for the rat medial gastrocnemius confirmed a similar distribution pattern of muscle spindles to that found in cat limb muscles (i.e. the majority of spindles were located in the proximo-medial parts). However, a similar concentration of muscle spindles in the proximal parts of hindlimb muscles was not reported in the locomotor soleus muscles of male C57BL/6 mice. In this case, the muscle spindles were observed in the belly of the muscle and covered approximately 20%–90% of the entire muscle length (Zeller-Plumhoff et al., 2017).

Muscle spindle length was similar for male and female rats. This absence of differences in muscles spindle length and those of recently reported muscle spindle diameters and intrafusal fibres (Gartych et al., 2021) contrast with the considerable intersex differences in extrafusal muscle fibre diameter, muscle mass and size, which have been documented for the same muscle (Mierzejewska-Krzyżowska et al., 2011), along with differences in extrafusal muscle fibre length (Chow et al., 2000). These observations indicate that factors affecting differences in muscle mass, such as the activity of male hormones during development (Bell, 2018; Gegenhuber et al., 2022), have limited influence on the development of muscle spindles in skeletal muscles. A possible reason for this may be a protective role of the collagen capsule surrounding the muscle spindle (Kennedy & Yoon, 1979) or the fact that muscle spindle maturation occurs earlier than that of extrafusal muscle fibres, which has been noted for human masseter and biceps brachii muscles (Österlund et al., 2011).

The reported length of muscle spindles in the rat medial gastrocnemius (average length of 3.30 and 3.26 mm for male and female muscles, respectively) in this study can be compared to those in the literature for various mammalian muscles. The length of intrafusal muscle fibres in different mammalian muscle spindles (predominantly in human and cat muscles) can vary between 8 and 10 mm (Boyd, 1962). The literature indicates that this parameter appears to depend on body and/or muscle size. For example, muscle spindle lengths for small human muscle tensor tympani (damping the noise produced by chewing) amount to 1.49 mm, but those for the smallest human stapedius muscles (damping the vibrations of the stapes) are only 0.49 mm (Kierner et al., 1999). Moreover, the length of the muscle spindles varied from 1.5 to 4 mm in both men and women in the longus coli (neck flexor) and multifidus muscles (spine stabiliser) (Boyd-Clark et al., 2002). In hindlimb muscles of female C57BL/6 mice, the muscle spindle was shorter than of the rat muscles studied here and varied in the tibialis anterior (dorsiflexion of the foot and its inversion) and extensor digitorum longus (dorsiflexion of the foot) by approximately 0–2 mm, whereas the locomotor gastrocnemius and soleus muscles showed 0–1.5 mm of variation (Lian et al., 2022).



**FIGURE 4** (a–f) Distribution and length of muscle spindles in a male (left) and female (right) medial gastrocnemius of a rat. (a, b) The number of muscle spindles located within 10 designated divisions. (c, d) The lengths of muscle spindles in the studied muscle. (e, f) The mean values  $\pm$ SD of the length of muscle spindles belonging to all divisions. The figure presents collected data for muscle spindles from 10 male and 10 female rats.

This study used the technique of 3D visualisation to observe the muscle spindles in sample medial gastrocnemius muscle. This was the first study to reveal the distribution of the muscle spindles and their spatial layout in a three-dimensional virtual manner since previous studies have only prepared 2D visualisations or models constituted in a single axis (Lian et al., 2022; Zeller-Plumhoff et al., 2017).

## 5 | CONCLUSION

The muscle spindles in rat medial gastrocnemius were distributed predominantly in the proximo-medial part of the muscle, and both the distribution of muscle spindles and their length in male and female animals were similar despite significant differences in muscle mass and size. The 3D reconstruction technique, which was used for the first time here in the study of the spatial distribution of muscle spindles, can be considered a useful tool for further studies assessing the sensory innervation of skeletal muscles.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. Celichowski provided the conception of the study; M. Piotr, K. Skiersz-Szewczyk, H. Jackowiak and J. Celichowski acquired the data; M. Piotr, K. Skiersz-Szewczyk and H. Jackowiak involved in the analysis of the data; M. Piotr drafted the manuscript; H. Jackowiak and J. Celichowski critically revised the manuscript; M. Piotr, K. Skiersz-Szewczyk, H. Jackowiak and J. Celichowski gave the approval for the article.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Polish National Science Centre (Grant No. 2018/31/B/NZ7/01028). The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

M. Piotr  <https://orcid.org/0000-0001-5725-9601>

## REFERENCES

- Barker, D. & Chin, N.K. (1960) The number and distribution of muscle-spindles in certain muscles of the cat. *Journal of Anatomy*, 94(4), 473–486.
- Bell, M.R. (2018) Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*, 159, 2596–2613.
- Boyd, I.A. (1962) The structure and innervation of the nuclear bag muscle fibre system and the nuclear chain muscle fibre system in mammalian muscle spindles. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 245(731), 81–136.
- Boyd-Clark, L.C., Briggs, C.A. & Galea, M.P. (2002) Muscle spindle distribution, morphology, and density in longus colli and multifidus muscles of the cervical spine. *Spine*, 27(7), 694–701.
- Bredman, J.J., Weijs, W.A. & Brugman, P. (1991) Relationships between spindle density, muscle architecture and fibre type composition in different parts of the rabbit masseter. *European Journal of Morphology*, 29(3), 297–307.
- Chow, R.S., Medri, M.K., Martin, D.C., Leekam, R.N., Agur, A.M. & McKee, N.H. (2000) Sonographic studies of human soleus and gastrocnemius muscle architecture: gender variability. *European Journal of Applied Physiology*, 82(3), 236–244.
- Eldred, E., Yung, L. & Eldred, D. (1998) Distribution of muscle spindles in a simply structured muscle: integrated total sensory representation. *The Anatomical Record*, 251(2), 161–172.
- Gartych, M., Jackowiak, H., Bukowska, D. & Celichowski, J. (2021) Evaluating sexual dimorphism of the muscle spindles and intrafusal muscle fibers in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15, 734555.
- Gegenhuber, B., Wu, M.V., Bronstein, R. & Tollkuhn, J. (2022) Gene regulation by gonadal hormone receptors underlies brain sex differences. *Nature*, 606(7912), 153–159.
- James, G., Stecco, C., Blomster, L., Hall, L., Schmid, A.B., Shu, C.C. et al. (2022) Muscle spindles of the multifidus muscle undergo structural change after intervertebral disc degeneration. *European Spine Journal*, 31, 1879–1888.
- Kennedy, W.R. & Yoon, K.S. (1979) Permeability of muscle spindle capillaries and capsule. *Muscle & Nerve*, 2(2), 101–108.
- Kierner, A.C., Zelenka, I., Lukas, J.R., Aigner, M. & Mayr, R. (1999) Observations on the number, distribution and morphological peculiarities of muscle spindles in the tensor tympani and stapedius muscle of man. *Hearing Research*, 135(1–2), 71–77.
- Kokkorigiannis, T. (2004) Somatic and intramuscular distribution of muscle spindles and their relation to muscular angiotypes. *Journal of Theoretical Biology*, 229, 263–280.
- Lian, W., Hao, F., Hao, P., Zhao, W., Gao, Y., Rao, J.-S. et al. (2022) Distribution heterogeneity of muscle spindles across skeletal muscles of lower extremities in C57BL/6 mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 838951.
- Manal, K.M., Roberts, P. & Buchanan, T.S. (2006) Optimal pennation angle of the primary ankle plantar and dorsiflexors: variations with sex, contraction intensity, and limb. *Journal of Applied Biomechanics*, 22(3), 255–263.
- May, A., Bramke, S., Funk, R.H.W. & May, C.A. (2018) The human platysma contains numerous muscle spindles. *Journal of Anatomy*, 232, 146–151.
- Mierzejewska-Krzyżowska, B., Bukowska, D., Taborowska, M. & Celichowski, J. (2014) Sex differences in the number and size of motoneurons innervating rat medial gastrocnemius muscle. *Anatomy, Histology & Embryology*, 43, 182–189.
- Mierzejewska-Krzyżowska, B., Drzymala-Celichowska, H., Bukowska, D. & Celichowski, J. (2011) Gender differences in morphometric properties of muscle fibres measured on cross-sections of rat hindlimb muscles. *Anatomia Histologia Embryologia*, 41(2), 122–129.
- Österlund, C., Liu, J.-X., Thornell, L.-E. & Eriksson, P.-O. (2011) Muscle spindle composition and distribution in human young masseter and biceps brachii muscles reveal early growth and maturation. *Muscle Biology*, 294, 683–693.
- Ovalle, W.K., Dow, P.R. & Nahirney, P.C. (1999) Structure, distribution and innervation of muscle spindles in avian fast and slow skeletal muscle. *Journal of Anatomy*, 194, 381–394.
- Saverino, D., De Santanna, A., Simone, R., Cervioni, S., Cattrysse, E. & Testa, M. (2014) Observational study on the occurrence of muscle spindles in human digastric and mylohyoid muscles. *BioMed Research International*, 2014, 294263.
- Scott, J.J. & Young, H. (1987) The number and distribution of muscle spindles and tendon organs in the peroneal muscles of the cat. *Journal of Anatomy*, 151, 143–155.
- Takahashi, K., Shiotani, H., Evangelidis, P.E., Sado, N. & Kawakami, Y. (2022) Three-dimensional architecture of human medial gastrocnemius fascicles in vivo: regional variation and its dependence on muscle size. *Journal of Anatomy*, 241, 1324–1335.
- Zeller-Plumhoff, B., Roose, T., Katsamenis, O.L., Mavrogordato, M.N., Torrens, C., Schneider, P. et al. (2017) Phase contrast synchrotron radiation computed tomography of muscle spindles in the mouse soleus muscle. *Journal of Anatomy*, 230, 859–865.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Piotr, M., Skiersz-Szewczyk, K., Jackowiak, H. & Celichowski, J. (2023) Distribution and length of muscle spindles and their 3D visualisation in the medial gastrocnemius of male and female rats. *Journal of Anatomy*, 00, 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13895>

