

## ジチオトレイトールが高強度運動後の骨格筋筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性に及ぼす影響

土持 裕胤<sup>1)</sup> 稲嶋 修一郎<sup>2)</sup> 和田 正信<sup>2)</sup>

### EFFECT OF DITHIOTHREITOL ON Ca<sup>2+</sup>-ATPase ACTIVITY OF SARCOPLASMIC RETICULUM IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER HIGH-INTENSITY EXERCISE

HIROTSUGU TSUCHIMOCCHI, SHUICHIRO INASHIMA and MASANOBU WADA

#### Abstract

Although the precise mechanisms underlying the dysfunction of sarcoplasmic reticulum (SR) that occurs during skeletal muscle fatigue remain obscure, it has been hypothesized that it may be attributable to oxidation of critical sulfhydryl groups residing in SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase protein by endogenously produced reactive oxygen species. In order to test this hypothesis, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities in the absence or presence of the disulfide reducing agent, dithiothreitol (DTT), were examined in muscle homogenates of the soleus muscles (SOL) and the superficial portions of the vastus lateralis muscles (VS) from the rat subjected to exhaustive running at 50 m/min on a 10% grade. Immediately after exercise, the catalytic activity of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase was significantly depressed in VS, but not in SOL. The loss of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity observed in VS was fully recovered after treatment with DTT (1 mM). These recovery effects of a potent disulfide reducing agent suggest that important proteins of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase may be oxidized during high-intensity exercise and that the onset of muscular fatigue may be delayed by the improved function of the cellular antioxidant

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2001, 50 : 325~332)

**key word** : sarcoplasmic reticulum, muscular fatigue, oxidation, sulfhydryl, reducing agent

#### I. 緒 言

一般に、筋小胞体(sarcoplasmic reticulum ; SR)のCa<sup>2+</sup>放出および取り込み能力が、骨格筋の張力特性に大きく影響することはよく知られている。そのため筋疲労のメカニズムを解明するためには、SRの機能との関連を明らかにすることは重要である<sup>1~4)</sup>。例えば、電気刺激などにより筋収縮を繰り返して張力が著しく低下した筋では、SRのCa<sup>2+</sup>放出・取り込み速度が低下している事実は<sup>5,6)</sup>、収縮活動に伴う筋疲労の要因の1つがSRの機能不全にあることを示唆する<sup>7,8)</sup>。

SRによるCa<sup>2+</sup>の放出が拡散によってなされるのに対して、取り込みは能動的に行われ、SR

の膜上に存在するCa<sup>2+</sup>-ATPase (SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase)の触媒作用によりATP 1 molが分解されると、Ca<sup>2+</sup> 2 molが筋筋質からSR内腔へと輸送される<sup>9)</sup>。疲労した筋では、Ca<sup>2+</sup>取り込み速度とSR Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性とはほぼ同様の割合で低下することが認められており<sup>2,3)</sup>、これらのことから、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性の変化がCa<sup>2+</sup>取り込み速度低減を決定する重要な因子であると考えられている<sup>7,8)</sup>。SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性が低下する原因としては、H<sup>+</sup>や無機リンなどの増加が知られている<sup>10)</sup>。しかしながら、安静時の細胞内環境と類似した溶液中で測定しても、疲労した筋のSR Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性は依然低下しており、したがってSR Ca<sup>2+</sup>-ATPaseタンパ

<sup>1)</sup> 広島大学医学部  
〒734-8551 広島市南区霞1-2-3

School of Medicine, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami, Hiroshima, 734-8551

<sup>2)</sup> 広島大学総合科学部  
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1

Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, 1-7-1, Kagamiyama, Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-8521

クの構造的変化も活性低下の成因である可能性が高い<sup>2,6)</sup>.

SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性は, 酸化剤であるペルオキシ二硫酸アンモニウムや活性酸素種の1つである次亜塩素酸によって低下することが報告されている<sup>11,12)</sup>. これらの報告および収縮活動を繰り返すと筋細胞内が酸化的条件下に置かれるとする知見<sup>13)</sup>から, 運動に伴う ATPase の構造的変化にタンパクの酸化が関与している可能性が高い. もし, 酸化ストレスによってタンパクが酸化されて SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性が低下するのであれば, 還元剤を反応溶液中に添加し活性を測定すれば, 減少した活性値が回復すると考えられる. しかしながら, この可能性について検討した報告はまだみあたらない. そこで本研究では, ラットに疲労困憊に至る高強度ランニングを行わせ, この可能性の有無について検討した.

## II. 実験方法

### A. 被検動物および実験プロトコール

実験には, Wistar 系雄性ラット16匹を用いた. 水と飼料(日本クレア製飼育繁殖用飼料)は自由摂取とし, 12時間の明暗サイクルの照明下で温度を21~27℃に常時維持した飼育室において飼育した. 3週齢から飼育を始め, 1週間の予備飼育後, 電動式小動物用トレッドミル(夏目製作所製, KN-73型)での走行に慣れさせるため, 週2回, 1日10分のランニング運動(上り勾配10%, 速度10~50 m/min)を全てのラットに5週間行わせた. 9週齢時に, これらをコントロール(control; C)群(n=8)と運動群(exercised; E)群(n=8)にランダムに分け, E群には速度50 m/min, 上り勾配10%で疲労困憊に至るまでランニングを行わせた. この運動強度は, Brooke & White<sup>14)</sup>の報告から換算すると100% $\dot{V}O_2$ max に相当する.

運動終了直後に, ラットをジエチルエーテルで麻酔し, 両脚から走運動の主働筋であるヒラメ筋および外側広筋表層部を摘出した. 筋サンプル約100 mg を氷で冷却した抽出液(300 mM sucrose を含む40 mM Tris 緩衝液, pH7.4)でよく洗浄した後, ガラスホモジナイザーを用い9倍

(mass/vol.)の抽出液でホモジナイズし, 得られたサンプルを SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の測定に用いた. 残りの筋を-80℃で保存し, 水分含有率, 筋グリコーゲン濃度および筋乳酸濃度の分析に用いた.

### B. 分析項目

#### 1. 水分含有率, 筋グリコーゲン濃度および筋乳酸濃度

フリーズドライヤー(タイテック, VD-16型)を用い筋を-70℃で24時間凍結乾燥し, 湿重量と乾燥重量の差から筋の水分含有率を算出した. 凍結乾燥したサンプルを, クーリングポンプ(タイテック, CH-150 B 型)で-5~-10℃に冷却した2 M perchloric acid 中に約20分放置した後, 10分間遠心分離(10,000 g)した. 得られた上清を乳酸濃度, ペレットをグリコーゲン濃度の分析に用い, Lowry & Passonneau<sup>15)</sup>の方法に従って測定を行った. 濃度分析用の反応溶液は, グリコーゲンでは50 mM Tris/HCl pH8.1, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithiothreitol, 0.3 mM ATP, 0.05 mM NADP, 0.035 U/ml glucose-6-dehydrogenase, 7 U/ml hexokinase, 乳酸では100 mM hydradine pH10.0, 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol, 0.5 mM NAD, 8 mM lactate dehydrogenase であった. 各々の反応溶液1.98 ml にサンプル20  $\mu$ l を加え, 暗所に約60分間室温で放置した後, 蛍光分光光度計(島津製作所製, RF-5000型)を用い, グリコーゲンの測定ではNADPH, また乳酸の測定ではNADH由来の蛍光値を測定した(励起波長340 nm, 蛍光波長460 nm).

#### 2. SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性は, 37℃の条件下で Simonides & van Hardeveld<sup>16)</sup>の方法に従って測定した. 反応溶液の組成は, 1 mM EGTA, 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 200 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 0.4 mM NADH, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphoenolpyruvate, 18 U/ml pyruvate kinase, 18 U/ml lactate dehydrogenase, pH7.5 であった. ジチオトレイトール(dithiothreitol;

DTT)は、スルフヒドリル基を保護したりジスルフィド結合を切断する作用をもつ還元剤である。先行研究<sup>11,12)</sup>において、この試薬はSR ATPase タンパクのSH基の変化を検出するために頻繁に用いられてきており、本研究においてもこれを反応溶液に添加することにより、運動がSRに酸化ストレスを与えたか否かを検討した。Eley et al.<sup>17)</sup>は酸化に起因して減少した筋タンパクのSH基の数が、1 mM DTTを含む溶液でインキュベートすることによって、元のレベルにほぼ回復することを認めており、本研究では彼らの報告に基づき添加する濃度を1 mMとした。ホモジネート20  $\mu\text{l}$ を反応溶液1.96 mlに加え2分間インキュベートした後、4 mM(最終濃度)ATPを加え反応を開始し、分光光度計(日本分光社製、V-530 iR型)を用い、波長340 nmでNADH由来の吸光度の変化を測定した。ここで得られる活性は、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseだけではなく $\text{Mg}^{2+}$ -ATPaseの触媒作用が混在した値( $\text{Mg}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性)である<sup>18)</sup>。そこで、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性だけを特異的に抑制するために、反応溶液中の $\text{CaCl}_2$ の濃度を2 mMにあげ、さらに吸光度の変化を測定し、 $\text{Mg}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性から $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase活性を差し引いた値をSR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性とした<sup>16)</sup>。

### C. 統計処理

統計量は、平均±標準偏差で示した。C群とE群の比較には対応のないt検定を、同一群内におけるDTTの影響の検討には対応のあるt検定を用いた。なお、統計処理の有意性は5%水準で判定した。

## III. 実験結果

### A. 走行時間および水分含有率

E群の疲労困憊にまで至る走行時間は、平均180±73秒(最高=310秒, 最低=110秒)であった。本研究ではSR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性を筋湿重量当たりで表わした。しかしながら、Sjogaard & Saltin<sup>19)</sup>は、運動を行うと筋の水分含有量が大きく変化することを報告している。もし、本研究でも同様の

現象が生じているのであれば、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性値を変動させる可能性がある。そこで、この可能性を確かめるため、筋の水分含有率を算出した。水分含有率は、ヒラメ筋においてはC群で76.0±1.0%, E群で75.0±2.0%であった。また、外側広筋表層部においてはC群で76.4±1.4%, E群で77.4±2.6%であり、両筋ともにC群とE群の間に有意な差異は認められなかった。

### B. 筋グリコーゲンおよび乳酸濃度

本研究でラットに負荷した運動によって、筋グリコーゲンは顕著に低下した。C群に対するE群の値は、外側広筋表層部で46.5%, ヒラメ筋で55.2%であり、両群間の差異は統計的に有意であった(Fig. 1)。この結果は、ランニング運動に際して両筋が収縮に動員されたことを示している。一方、筋乳酸濃度は外側広筋表層部にのみ有意な

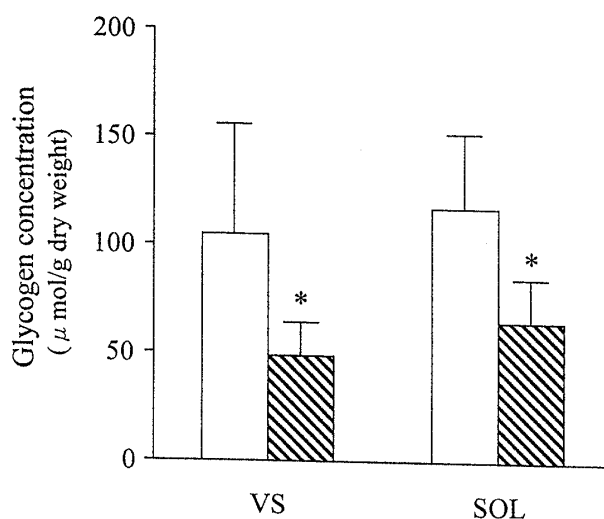


Fig. 1. Concentration of glycogen in the superficial portions of the vastus lateralis muscles (VS) and the soleus muscles (SOL) from control (□) and exercised (▨) groups.

Values are means±SD. \*P<0.05, compared with control.

変化が認められ(Fig. 2), E群ではC群より62.8%高い値が観察された。

### C. ジチオトレイトールが $\text{Mg}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に及ぼす影響

前述のように、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性は、

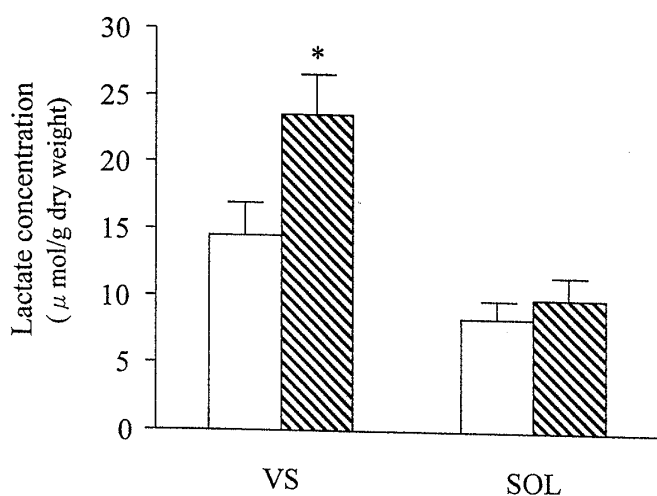


Fig. 2. Concentration of lactate in the superficial portions of the vastus lateralis muscles (VS) and the soleus muscles (SOL) from control (□) and exercised (▨) groups. Values are means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , compared with control.

Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性から Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性を差し引くことによって算出される。仮に, DTT が Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性を変動させる作用をもつとすると, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性もみかけ上変化することになる。そこで予備実験において, その可能性について検討した。Table 1 に示されるように, 1 mM の DTT でインキュベートすることによって, 本研究で用いた 2 つの筋における Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性に有意な変化は認められなかった。

#### D. SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

一過性の運動に対する SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性 (DTT を添加しなかった場合) の反応応答は, 本研究で用いた 2 つの筋で異なった。外側広筋表層部では, C 群と比べ E 群で 14.0% 低値が認められ,

Table 1. Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum in absence (−) and presence (+) of dithiothreitol.

	n	−DTT			+DTT		
		Mg <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
VS	8	43.0 $\pm$ 3.8	4.7 $\pm$ 0.8	38.3 $\pm$ 3.4	43.6 $\pm$ 4.4	4.9 $\pm$ 0.9	38.7 $\pm$ 4.0
SOL	8	18.2 $\pm$ 4.2	4.7 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 3.5	17.5 $\pm$ 4.7	4.7 $\pm$ 0.7	12.7 $\pm$ 4.0

Values are means  $\pm$  SD in  $\mu$ mol/min/g; n, number of samples; VS, superficial portion of vastus lateralis muscle; SOL, soleus muscle.

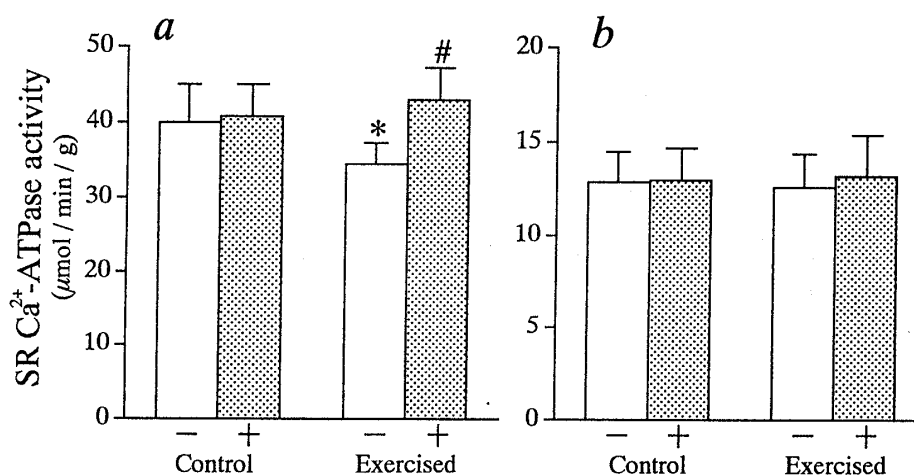


Fig. 3. Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in absence (−) and presence (+) of dithiothreitol from the superficial portions of the vastus lateralis muscles (a) and the soleus muscles (b). Values are means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , compared with control. # $P < 0.05$ , compared with the activity in absence of dithiothreitol.

両群間の差異は統計的に有意であった (Fig. 3 a). 一方、ヒラメ筋では両群間に差異は認められなかった。

DTT が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に及ぼす影響を検討するために、各々の群内において DTT を添加した場合と添加しなかった場合の活性値を比較した。ヒラメ筋の C 群と E 群および外側広筋表層部の C 群では、DTT の影響は認められなかった。これに対して、外側広筋表層部の E 群では、添加した時の方が有意に高い値が示された (Fig. 3 a). この E 群の DTT を添加した時の値と C 群の DTT を添加しなかった時の値との間には、有意な違いはみられなかった。この結果は、運動により低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が、還元剤である DTT によってほぼ回復したことを示すものである。

#### IV. 考 察

筋疲労の研究分野では、摘出した筋を目的とする環境下に起き、電気刺激などで収縮させ、種々のパラメーターを測定する方法が多く用いられている。それらの中で、刺激頻度と SR の機能の変化について検討した Ward et al.<sup>6)</sup> の報告は興味深い。彼らは、カエルの骨格筋に 0.5 秒に 1 回、2 秒に 1 回および 5 秒に 1 回 (1 回 100 msec, 100 Hz) の 3 種類の頻度の刺激を数分間与え、張力の低下の割合が同程度であれば、刺激頻度に関わりなく、ほぼ同様の割合で SR の機能の不全が起こることを認めている。このような実験では条件を厳密に制御できるという利点がある反面、試験管内で人為的につくられた環境が、どの程度生体内で起こる事象を反映しているのかについては疑問が残る部分がある。しかしながら、筋活動に伴う SR の機能の変化については、疲労困憊に至る一過性の運動を行ったヒトから採取されたバイオプシーサンプルを用いた研究からも確認されており、Gollnick et al.<sup>20)</sup> は高強度・短時間運動において、Booth et al.<sup>21)</sup> および Tupling et al.<sup>3)</sup> は中強度・長時間運動において、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込み速度あるいは SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が低下したことを報告している。本研究で得られた結果はこれら

の先行研究と一致するとともに、筋疲労に対して興奮・収縮連関の変化が重要な要因をなすとする知見<sup>7,8)</sup> を支持するものである。

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は、26 個のシステイン残基を含んでおり、これらに含まれるスルフヒドリル基の酸化・還元状態が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパクの触媒作用に大きな影響を及ぼすことが認められている<sup>11,22)</sup>。本研究で得られた最も重要な知見は、ジスルフィド結合の還元剤である DTT によって、運動によって減少した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が、回復したことであり (Fig. 3 a), この結果から運動による SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下は、主として SR を構成する free SH 基が酸化されたために生じたことが示唆される。

fluorescein isothiocyanate は、アデニンヌクレオチド結合部位に存在するリシン残基に特異的に結合する試薬である。Luckin et al.<sup>23)</sup> および Leberer et al.<sup>24)</sup> は、長時間運動を行った齧歯類の骨格筋において、SR に対する fluorescein isothiocyanate の結合量が低下したことを認め、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が低下するのは  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプタンパクの ATP 結合部位が修飾を受けるためであろうと結論している。先に述べたように、SR の機能の不全が運動強度を問わず殆ど全てのタイプの運動で起こるのであれば、その成因もかなりの部分共通していることは十分に考えられる。本研究で用いた運動形態は Luckin et al.<sup>23)</sup> および Leberer et al.<sup>24)</sup> とは異なるものであったが、これらのことから、疲労困憊に至る激しい筋活動によって、SR の ATP 結合部位の構造に影響する free SH 基が酸化されることが推察される。

細胞内には酸化に対する防御機構が存在し、これらは酵素的防御系と非酵素的防御系に分けられる。非酵素的防御系の中で中心的な役割を果たしているのが低分子チオールである還元型グルタチオン (reduced glutathione; GSH) であり、細胞内が酸化的条件に暴露されると、みずから酸化されることにより、細胞の酸化を防御することが知られている。筋に含まれる GSH の濃度は、外側広筋表層部と比べヒラメ筋において約 6 倍高く<sup>25)</sup>、本研究においてヒラメ筋の SR  $\text{Ca}^{2+}$ -

ATPase 活性が運動によって変化しなかったのは (Fig. 3 b), 豊富に存在する GSH が  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプタンパクを酸化から保護したことが, その成因の 1 つであると思われる.

Khawli & Reid<sup>26)</sup> は, 細胞内の GSH を増加させるよう作用する薬物である N-Acetylcysteine (NAC) を含む溶液中で, 摘出したラットの横隔膜を取縮させると, 疲労耐性が増すことを報告している. 筋細胞内で酸化により機能が低減する器官は SR だけではないが<sup>27)</sup>, Khawli & Reid<sup>26)</sup> が観察した NAC による疲労耐性亢進のメカニズムの 1 つとして, GSH の増加により長時間 SR が酸化から保護され, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下が遅延することが, 本研究の結果から考えられる. NAC は臨床の現場で使用されている薬物であり, これをヒトに対して処方することにより, 運動能力の向上を図ることができる可能性がある.

## V. 総 括

本研究の目的は, 一過性の運動による筋小胞体 (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) 活性の低下が,  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプタンパクが酸化されたために起こるとする仮説を検証することであった. Wistar 系雄ラットをコントロール (C) 群と運動 (E) 群に分け, E 群には  $100\% \dot{V}\text{O}_2\text{max}$  に相当する強度で疲労困憊に至るまでランニングを行わせた. 運動終了直後に摘出した外側広筋表層部およびヒラメ筋を分析に用い, 以下の結果を得た.

1. E 群の疲労困憊に至るまでの走行時間は, 平均  $180 \pm 73$  秒であった. また, 筋の水分含有率は, ヒラメ筋および外側広筋表層部の両方において, C 群と E 群との間に差異は認められなかった.
2. 筋グリコーゲン濃度は, 両筋において C 群と比較し E 群で有意な低値がみられ, C 群に対する E 群の値は, 外側広筋表層部で 46.5%, ヒラメ筋で 55.2% であった.
3. 筋乳酸濃度は, 外側広筋表層部においてのみ両群間に差異がみられ, E 群で C 群より 62.8% 高い値が観察された.

4. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は, ジスルフィド結合の還元剤であるジチオトレイトール (DTT) を反応溶液に加えた場合と加えない場合の 2 種類の 방법으로測定した. ヒラメ筋ではどちらの方法で測定しても, C 群と E 群との間に差異は示されなかった.

5. 外側広筋表層部では, DTT を添加しない場合は E 群で C 群と比べ 14.0% の低値が認められた. 同一群内で DTT を添加した場合としない場合を比較すると, C 群では違いはみられなかったが, E 群では添加した場合に有意な高値が観察された. この E 群の値は, 2 種類の 방법으로測定された C 群のものとは有意な差異はなかった.

以上のことから, 疲労困憊に至る一過性の高強度運動による SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下は, 主として  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプタンパクのスルフィド基が酸化されるために起こることが示唆された. 細胞内の抗酸化能力を高めることによって, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下を遅延できることが考えられる.

「本研究の一部は, 平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金 (# 11680032) によって行われたものである。」

(受理日 平成 13 年度 2 月 17 日)

## 文 献

- 1) Favero, T. G., Zable, A. C., Colter, D. and Abramson, J. J. Lactate inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Ca}^{2+}$ -channel activity from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.* (1997), **82**, 447-452.
- 2) Matsunaga, S., Tsuchimochi, H., Inashima, S., Hazama, T., Niihata, S. and Wada, M. Alterations in function of sarcoplasmic reticulum after acute high-intensity exercise. *Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med.* (2000), **49**, 139-148, (in Japanese).
- 3) Tupling, R., Green, H., Grant, S., Burnett, M. and Ranney, D. Postcontractile force depression in human is associated with an impairment in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -pump function. *Am. J. Physiol.* (2000), **278**, R 87-R 94.
- 4) Lamb, G. D. and Cellini, M. A. High intracellular [ $\text{Ca}^{2+}$ ] alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol.* (1999), **519**, 815-827.

- 5) Williams, J. H., Ward, C. W., Spangenburg, E. E. and Nelson, R. M. Functional aspects of skeletal muscle contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum after fatigue. *J. Appl. Physiol.* (1998), **85**, 619-629.
- 6) Ward, C. W., Spangenburg, E. E., Diss, L. M. and Williams, J. H. Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum uptake and release. *Am. J. Physiol.* (1998), **275**, R99-R104.
- 7) Williams, J. H. and Klug, G. A. Calcium exchange hypothesis of skeletal muscle fatigue : a brief review. *Muscle Nerve* (1995), **18**, 421-434.
- 8) Byrd, S. K. Alterations in the sarcoplasmic reticulum : a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* (1992), **24**, 531-539.
- 9) Rungg, J. C. Calcium in muscle activation, Springer-Verlag, Berlin, (1986).
- 10) Stienen, G. J., Papp, Z. and Zaremba, R. Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned fibres of *Xenopus laevis*. *J. Physiol.* (1999), **518**, 735-744.
- 11) Scherer, N. M. and Deamer, D. W. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* (1986), **246**, 589-601.
- 12) Favero, T. G., Colter, D., Hooper, P. F. and Abramson, J. J. Hypochlorous acid inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.* (1998), **84**, 425-430.
- 13) Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1982), **107**, 1198-1205.
- 14) Brooke, G. A. and White, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.* (1978), **45**, 1009-1015.
- 15) Lowry, O. H. and Passonneau, J. V. A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press, New York, (1972).
- 16) Simonides, W. S. and van Hardeveld, C. An assay for sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in muscle homogenate. *Anal. Biochem.* (1990), **191**, 321-331.
- 17) Eley, D. W., Korecky, B. and Fliss, H. Dithiothreitol restores contractile function to oxidant-injured cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* (1989), **257**, H1321-H1325.
- 18) Green, H. J., Grange, F., Chin, C., Goreham, C. and Ranney, D. Exercise-induced decreases in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity attenuated by high-resistance training. *Acta Physiol. Scand.* (1998), **164**, 141-146.
- 19) Sjogaard, G. and Saltin, B. Extra- and intracellular water spaces in muscles of man at rest and with dynamic exercise. *Am. J. Physiol.* (1982), **243**, R271-R280.
- 20) Gollnick, P. D., Korge, P., Karpakka, J. and Saltin, B. Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiol. Scand.* (1991), **142**, 135-136.
- 21) Booth, J., McKenna, M. J., Ruell, P. A., Gwinn, T. H., Davis, G. M., Thompson, M. W., Harmer, A. R., Hunter, S. K. and Sutton, J. R. Impaired calcium pump function does not slow relaxation in human skeletal muscle after prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* (1997), **83**, 511-521.
- 22) Xu, K. Y., Zweier, J. L. and Becker, L. C. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ. Res.* (1997), **80**, 76-81.
- 23) Luckin, K. A., Favero, T. G. and Klug, G. A. Prolonged exercise induces structural changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* (1991), **46**, 391-405.
- 24) Leberer, E., Härtner, K.-T. and Pette, D. Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* (1987), **162**, 555-561.
- 25) Ji, L. L., Fu, R. G. and Mitchell, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle : effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* (1992), **73**, 1854-1859.
- 26) Khawli, F. A. and Reid, M. B. N-Acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm. *J. Appl. Physiol.* (1994), **77**, 317-324.
- 27) Wilson, G. J., Remedios, C. G. d., Stephenson, D. G. and Williams, D. A. Effects of sulfhydryl modification on skinned rat skeletal fibres using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *J. Physiol.* (1991), **437**, 409-430.