

甲状腺機能亢進症モデルラットにおけるヒラメ筋の収縮機能と 筋原線維の酸化的修飾との関係

山田 崇史¹⁾ 三島 隆章²⁾ 坂本 誠²⁾
杉山 美奈子²⁾ 松永 智³⁾ 和田 正信¹⁾

RELATIONSHIP BETWEEN OXIDATION OF MYOFIBRILLAR PROTEINS AND CONTRACTILE PROPERTIES IN SOLEUS MUSCLES FROM HYPERTHYROID RAT

TAKASHI YAMADA, TAKAAKI MISHIMA, MAKOTO SAKAMOTO,
MINAKO SUGIYAMA, SATOSHI MATSUNAGA and MASANOBU WADA

Abstract

We tested the hypothesis that a force reduction in soleus muscles from hyperthyroid rats would be associated with oxidative modification of myofibrillar proteins. Daily injection of thyroid hormone [3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)] for 21 days depressed isometric forces in whole soleus muscle across a range of stimulus frequencies (1, 10, 20, 40, 75 and 100 Hz) ($P < 0.05$). In fiber bundles, hyperthyroidism also led to pronounced reductions ($P < 0.05$) in both K^+ - and 4-chloro-*m*-cresol-induced contracture forces. The degrees of the reductions were similar between these two contractures. These reductions in force production were accompanied by a remarkable increment (103%; $P < 0.05$) in carbonyl groups comprised in myofibrillar proteins. In additional experiments, we have also tested the efficacy of carvedilol, a non-selective β_1 - β_2 -blocker that possesses anti-oxidative properties. Treatment with carvedilol prevented T_3 -induced oxidation of myofibrillar proteins. However, carvedilol did not improve the hyperthyroid-induced reductions in force production. These data suggest that oxidative modification of myofibrillar proteins may not account for the reductions in force production of hyperthyroid rat soleus muscle.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2007, 56 : 473~480)

key word : reactive oxygen species, hyperthyroidism, specific force reduction, redox status

I. 緒 言

甲状腺機能亢進症の患者では、骨格筋の筋力あるいは疲労耐性の低下など、甲状腺性ミオパチーと呼ばれる症状が高い頻度で出現する¹⁾。これまでこれら筋機能の低下は、筋が萎縮することが主な原因であると考えられてきたが、本症の患者^{2,3)}あるいは甲状腺ホルモン(3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine; 以下, T_3)を投与した実験動物^{4~7)}において、張力は絶対値だけではなく、単位断面積当たり換算した値においても低下することが報告されている。したがっ

て、甲状腺性ミオパチーには、筋萎縮以外の因子も関与しているものと推察される。

近年、骨格筋の収縮機能における活性酸素種(reactive oxygen species; 以下, ROS)の役割が注目されている⁸⁾。ROSは低濃度では、興奮収縮連関などにおけるシグナル物質として重要な役割を果たしているが、高濃度では、骨格筋の機能を低下させるよう作用することが明らかとなっている^{9,10)}。事実、酸化ストレスが増大するような病理学的条件下では、抗酸化剤の投与によって発揮張力の低下が抑制されることが示されている^{11~13)}。

¹⁾ 広島大学大学院総合科学研究科
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1

²⁾ 広島大学大学院生物圏科学研究科
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1

³⁾ 大阪市立大学都市健康・スポーツ研究センター
〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
1-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
1-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521

Research Center for Urban Health and Sports, Osaka City University,
3-3-138, Sugimoto, Sumiyosi, Osaka, 558-8585

甲状腺機能亢進症についての報告では, 基礎代謝の亢進に伴い, ミトコンドリアで生成される ROS の量が増大すること^{14,15)}, また, 主として遅筋線維により構成されている筋において, 脂質およびタンパクの酸化を示すパラメーターが上昇することが認められている¹⁵⁾. 我々は先行研究において, T₃ を投与したラットのヒラメ筋では, 筋原線維の収縮機能が低下するとともに, 筋原線維タンパクが酸化的修飾を受けることを報告した⁷⁾. これらの結果からは, 甲状腺機能亢進症に起因する筋機能の低下に, 筋原線維の酸化が関与していることが示唆される⁷⁾. しかしながら, 筋原線維の機能低下とタンパクの酸化とが, ただ単に同時に起きただけであり, 両者の間に因果関係が存在しない可能性も残されている.

そこで本研究では, この問題を検討することを目的として, ラットに抗酸化物質と T₃ を投与し, ヒラメ筋における筋力および筋原線維の酸化還元動態を測定した.

II. 方 法

A. 被験動物

実験には, 9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い, これらを T₃ (Sigma 社製 T2752, Steinheim) を投与する群 (hyperthyroid; 以下, HY 群) と無処置の群 (euthyroid; 以下, EU 群) とに分けた. さらに, これらを抗酸化剤であるカルベディロール (carvedilol; 以下, car) (LKT Laboratories 社製 C3065, St. Paul,) を投与する群 (HY-car 群, EU-car 群) と投与しない群 (HY-non 群, EU-non 群) とに分けた. HY-car 群および HY-non 群には, リン酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した T₃ を (濃度 0.015%), 1 日体重 1 kg 当たり 300 μ g の割合で腹腔内に投与した⁷⁾. また, HY-car 群および EU-car 群には, エタノールで溶解した car を飲用加水に加え, 経口摂取させた. なお, car の投与量は 1 日体重 1 kg 当たり 2 mg であり¹³⁾, エタノールの最終濃度は 0.2% 未満になるようにした. 21 日間の投薬後, 麻酔下でヒラメ筋を採取し実験に供した. なお, 水および飼料 (日本クレア社製飼育繁殖固形飼料 CE-2, 東京) 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 21~24°C に常時維持した飼育室においてラットを飼育した. 本実験は, 広島大学動物実

験委員会の内規に従って実施した.

B. 等尺性張力の測定

片側の後肢から摘出したヒラメ筋をリンガー液 (1 mM MgCl₂, 115 mM NaCl, 5 mM KHCO₃, 20 mM NaHCO₃, 5 mM N, N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid, 2 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 0.3 mM glutamic acid, 0.38 mM glutamine, pH 7.4) でよく洗浄した後, 95%O₂~5%CO₂ ガスを通入した同組成のリンガー液中に置き, 重量約 30 mg の筋束を作成した. この筋束の片端を張力計 (日本光電社製 TB-611T, 東京, 日本) に, 反対側を固定用アームにセットした後, 単収縮力が最大値を示すよう筋長を調節した. 筋の両端に置かれた電極を介し, 電気刺激装置 (日本光電社製 SEN-7230, 東京) により収縮を誘起した. すべての測定において, 電気刺激に用いる矩形波の幅は 1 msec とし, 強度は最大張力が得られる電圧の 130% (40~48V) に設定した. なお, リンガー液の温度は, 実験中 30°C に保った. 実験では, 1, 10, 20, 40, 75, 100 Hz の刺激頻度における等尺性収縮力を測定した. 張力測定後, 筋長および筋重量を計測した. 筋横断面積は Ward¹⁶⁾ の方法に従い,

筋横断面積 (cm²)

$$= \text{筋重量 (g)} / [\text{筋長 (cm)} \times \text{筋密度 (g/cm}^3)]$$

の式に基づいて計算した. なお, 筋密度は, 1.07 g/cm³ とした¹⁷⁾. 張力は単位断面積当たりの相対値で表わした.

C. 拘縮張力の測定

もう一方の後肢から採取したヒラメ筋から, 上述と同様の方法で重量約 30 mg の筋束を作成し, リンガー液中で単収縮張力が最大値を示すように筋長を調節した. 10 分間の安静の後, リンガー液中の 115 mM NaCl を 100 mM K₂SO₄ に置換した溶液に筋を曝露し, K⁺ 誘因性の拘縮張力を測定した. その後さらに, リンガー液中で 5 分間安静を保持した後, 10 mM 4-chloro-*m*-cresol (以下; 4-CmC) 溶液に筋を曝露し, 4-CmC 誘因性の拘縮張力を測定した. なお, 先行研究において, 4-CmC は筋小胞体の Ca²⁺ 放出チャンネルに特異的に作用し, チャンネルを開口させる作用を有すること¹⁸⁾, ならびに 7.5 mM 以上の濃度で, 最大拘縮を誘起することが示さ

れている¹⁹⁾。張力を測定した後、筋横断面積を前述の方法により算出した。

D. 筋ホモジネイト

張力の測定に用いていない残りの筋サンプルを、ガラスホモジナイザーを用い20倍(w/v)の抽出液(300 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 6.5)でホモジネイトした²⁰⁾。液体中に含まれる酸素の量を抑制するために、抽出液を使用前に脱気し窒素を通過した。10,000 g で10分間遠心分離した後、筋原線維タンパク質として上清を採取し、分析まで-80℃の条件下で保存した。なお、タンパク濃度の測定は、Bradford²¹⁾の方法を用いて行った。

E. カルボニル含有量の測定

酸化的环境下では、アミノ酸の末端炭素に結合する水素が水酸基(OH)に置換される反応が起こることがある。末端炭素の3方向全てに水素が結合している場合、2つ以上の水素が置換された置換体は化学的に不安定であり、脱水反応により、カルボニル基(>C=O)へと変換される²²⁾。したがって、タンパクが酸化されると、そのタンパクに含まれるカルボニル基の量が増加することになり、このような事実に基づき、カルボニル含有量はタンパク酸化の指標として用いられている²²⁾。本研究では、カルボニル基の量は、Levineら²²⁾の方法に一部修正を加えたものを用い、筋ホモジネイトから測定した。150 μg の筋原線維タンパクを含むホモジネイトに、10 mM 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)を含む2 N HClを600 μl加えた。また、同量のホモジネイトに、DNPHを含まない2 N HCl溶液を加えたものをブランクとした。1時間室温で反応させた後、750 μlの20%(w/v)trichloroacetic acid (TCA)を加え、5分間氷上に置いた。その後、10,000 g で10分間遠心分離した後、上清を除き、1 mlの10% TCAを加えて5分間氷上で反応させた。10分間の遠心分離の後、上清を除去し、1 mlのethanol/ethyl acetateを加えて沈殿物を洗浄した。遊離したDNPHを完全に排除するために、洗浄は10分間の遠心分離を挟み3回行った。最終的に得られた沈殿物は、500 μlの6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3)を加えることで融解した後、反応生成物の量を分光光度計

(日本分光社製 UVIDE-660, 東京, 日本)を用いて測定した(波長 360 nm)。サンプルにおけるカルボニル基の量は、DNPHと反応させたものの吸光度から、ブランクの吸光度を引いた値から算出した。なお、吸光係数は22,000/M/cmを用いた。

F. 統計処理

各データは、平均±標準誤差で示した。T₃とcarの影響は、二元配置の分散分析を用い検討した。有意差が認められた場合はScheffé post hoc分析を行った。危険率は5%未満とした。

Ⅲ. 結 果

A. 体重、心重量および筋湿重量

HY群の体重は、EU群に比べ有意な低値を示した(表1)。一方、心重量は、絶対値、体重に対する相対値とも、EU群に比べHY群で有意な高値を示した。また、HY群の筋重量は、EU群に比べ絶対値では有意な低値を示したが、体重に対する相対値には変化は認められなかった。これらは、体内のT₃の濃度が高まったラットにおいて、典型的に生ずる変化であり、先行研究と一致するものである^{7,23)}。なお、我々は以前に、本研究と同量および同期間のT₃の投与により、血中遊離T₃濃度が正常ラットの約2.8倍に上昇することを確認している⁷⁾。

B. 等尺性張力

図1に、各群の等尺性張力の結果を示した。最大強縮張力は、HY-non群(1038.6±64.1 g/cm²)が、EU-non群(1247.3±68.1 g/cm²)よりも低値を示した。また、単収縮力においても、HY-non群がEU-non群よりも低値を示した(HY-non群: 177.8±8.4 g/cm², EU-non群: 255.8±21.3 g/cm²)。一方、HY-car群の発揮張力も、HY-non群と同様の傾向を示し、10 Hzから40 Hzの刺激頻度において、EU-non群と比べ有意な低値を示した。全ての刺激頻度において、HY-non群とHY-car群との間には、統計的に有意な差異は認められなかった。先行研究⁷⁾と同様に、T₃処置による強縮張力の低下率は、高頻度領域より低頻度領域において大きい傾向が認められた。これはT₃の投与によりヒラメ筋が速筋化し、単収縮における収縮・弛緩時間が短縮される

Table 1. Body, heart and soleus weights.

Rat	EU-non	EU-car	HY-non	HY-car
BWt (g)	396.1 ± 7.4 (10)	386.7 ± 9.1 (10)	332.2 ± 7.5 ^{*a} (10)	327.1 ± 6.8 ^{*a} (10)
HWt (mg)	1044.9 ± 41.9 (10)	984.3 ± 27.1 (10)	1571.8 ± 45.6 ^{*a} (10)	1594.8 ± 53.6 ^{*a} (10)
HWt BWt ⁻¹ (mg g ⁻¹)	2.63 ± 0.07 (10)	2.55 ± 0.04 (10)	4.74 ± 0.13 ^{*a} (10)	4.87 ± 0.11 ^{*a} (10)
SWt (mg)	148.7 ± 5.2 (10)	148.4 ± 5.5 (10)	118.5 ± 3.3 ^{*a} (10)	121.2 ± 8.3 ^{*a} (10)
SWt BWt ⁻¹ (mg g ⁻¹)	0.37 ± 0.01 (10)	0.39 ± 0.01 (10)	0.35 ± 0.01 (10)	0.38 ± 0.02 (10)

Values are means ± SE (number of samples); BWt, body weight; HWt, Heart weight; SWt, soleus weight; EU, euthyroid; HY, hyperthyroid; non, non-treated; car, carvedilol. ^{*}*P* < 0.05, compared with euthyroid group; ^a*P* < 0.05, compared with euthyroid-carvedilol group.

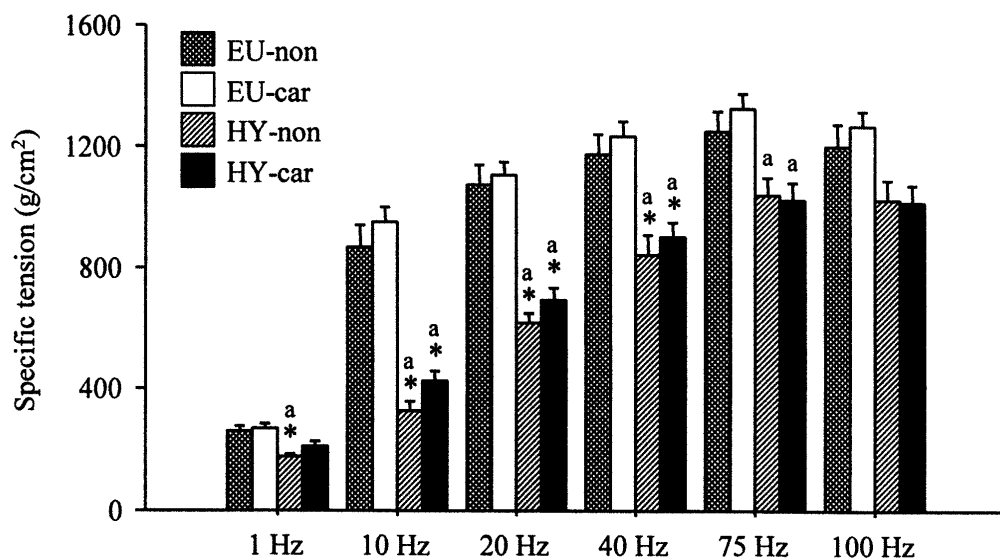


Fig. 1. Effects of T₃ and carvedilol treatment on isometric forces in soleus muscle. Values are means ± SE of *n* = 10 per group. EU, euthyroid; HY, hyperthyroid; non, non-treated; car, carvedilol. ^{*}*P* < 0.05, compared with euthyroid group, ^a*P* < 0.05, compared with euthyroid-carvedilol group.

ため、低頻度の刺激では、不完全強縮が生ずるためであると考えられている⁷⁾。

C. K⁺ および 4-CmC 誘因性拘縮張力

K⁺ 誘因性の拘縮張力は、EU-non 群に比べ HY-non 群で48%, HY-car 群で42%低下した(図2)。さらに、4-CmCによる拘縮張力もHY群において低下し、EU-non 群に対するHY群の低下率は、HY-non 群で36%, HY-car 群で31%であった(図3)。また、HY-non 群、HY-car 群ともに、2つの拘縮張力の低下率の間に有意差は認められなかった。

D. カルボニル含有量

ホモジネイトに含まれる筋原線維タンパクの濃度に、各群間で差異は認められなかった(結果は示していない)。一方、筋原線維タンパク質に含まれるカルボニル基の量は、HY-non 群が他の3群と比べ有意な高値を示した(図4)。

IV. 考 察

T₃ の投与により、単位断面積当たりの強縮張力が低下した結果は、先行研究⁵⁻⁷⁾と一致するとともに、甲状腺機能亢進症に伴うヒラメ筋の張力低下に、筋の萎縮以外の因子も関与していることを示唆

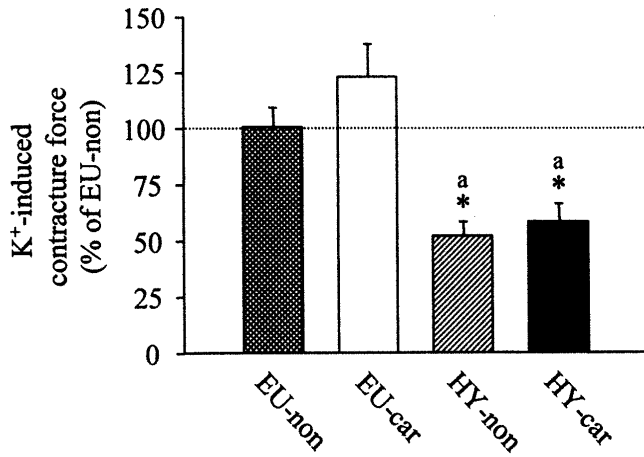


Fig. 2. Effects of T₃ and carvedilol treatment on K⁺-induced contracture forces in fiber bundles from soleus muscle. Values are means ± SE of *n* = 10 per group. EU, euthyroid; HY, hyperthyroid; non, non-treated; car, carvedilol. **P* < 0.05, compared with euthyroid group, ^a*P* < 0.05, compared with euthyroid-carvedilol group.

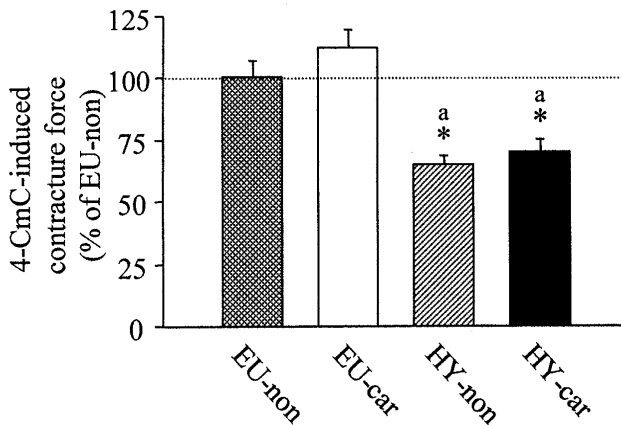


Fig. 3. Effects of T₃ and carvedilol treatment on 4-chloro-*m*-cresol (4-CmC)-induced contracture forces in fiber bundles from soleus muscle. Values are means ± SE of *n* = 10 per group. EU, euthyroid; HY, hyperthyroid; non, non-treated; car, carvedilol. **P* < 0.05, compared with euthyroid group, ^a*P* < 0.05, compared with euthyroid-carvedilol group.

する。本研究では、張力の低下が細胞内のどの器官の機能の変容によって招来されるのかを検討するために、高濃度 K⁺ あるいは 4-CmC かのどちらかを含む 2 種類の溶液を用いて拘縮張力を測定した。

張力低下の原因となる部位としては、1) 形質膜における活動電位の伝達不全、2) デイヒドロピリジン受容体から筋小胞体へのシグナル伝達の不全、3) 筋小胞体からの Ca²⁺ 放出機能の低下、4) 筋原線維の収縮機能の低下などがあげられる。我々は先行研究において、本研究と同期間の T₃ の投与に

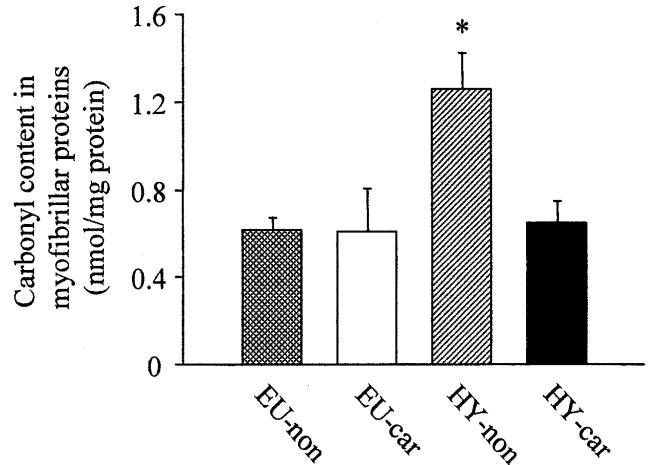


Fig. 4. Effects of T₃ and carvedilol treatment on carbonyl content of myofibrillar proteins in soleus muscle. Values are means ± SE of *n* = 10 per group. EU, euthyroid; HY, hyperthyroid; non, non-treated; car, carvedilol. **P* < 0.05, compared with the others.

よって、Na⁺-K⁺-ATPase 活性および Ca²⁺ 放出機能は低下しないことを観察しており^{6,7)}、1) および 3) が張力低下に参与した可能性は低いと考えられる。高濃度 K⁺ 溶液中では形質膜において脱分極が、一方、4-CmC 溶液中では筋小胞体からの Ca²⁺ の放出が起こることで、張力が発揮される。T₃ 処置群において、K⁺ 誘因性拘縮張力と 4-CmC 誘因性拘縮張力の低下率がほぼ一致した事実は、2) の可能性も否定するものであり、4) が筋力低下の主要因であることが示唆される。

甲状腺機能亢進症では、ミトコンドリアの活動が亢進し、正常な筋と比べ、ROS 生成量が増大することが広く認められている¹⁵⁾。また、実験動物に T₃ を一定期間投与すると、特に遅筋において、脂質あるいはタンパクが酸化的損傷を受けることが示されている^{7,24-26)}。筋原線維タンパクの酸化が生じることを示した本研究の結果は、これらの報告と一致するものである。

メチオニンとシステインは、特に ROS による修飾を受けやすいアミノ酸残基であり、Davies²⁷⁾ はこれらの残基が酸化されるとタンパクの機能が変化することを報告している。タンパクの種類によって、酸化に対する感受性に違いがみられるのは、構成するアミノ酸残基の種類がタンパク毎で異なることに起因すると考えられている^{28,29)}。

筋原線維では、ほぼ全てのタンパクが酸化の標的となることが示されている^{30,31)}。その中でも特に

ミオシン重鎖は、酸化的修飾を受けやすく、重鎖が酸化されるとクロスブリッジの結合状態が弱まるということが報告されている³²⁾。我々は T_3 の処置により、ミオシン重鎖が酸化的修飾を受けること、ならびに機能の低減が筋原線維レベルで生ずることを観察している⁷⁾。そして、重鎖酸化が発揮張力に及ぼす影響についての前述の先行研究から^{30~32)}、重鎖の酸化が筋原線維の機能低下の成因であろうと推察した。

本研究では、このことをさらに言及するために、抗酸化剤である car の作用について検討した。car は、その構成要素であるカルバゾールが ROS を直接捕捉する、あるいはヒドロキシラジカルの非酵素的生成過程に必須な鉄イオンをキレートするなどの作用を持つ薬物である¹³⁾。Dalla Lebera ら¹³⁾ は、car が筋原線維タンパクの酸化を抑制することを示しており、彼らの報告に基づき本研究では car を実験に用いた。

図 4 に示されるように、car の投与によって、 T_3 処置による筋原線維タンパクの酸化は抑制された。本研究では、ミオシン重鎖に含まれるカルボニル基の量については検討しなかったが、ミオシン重鎖が筋原線維全体の約30%を占めるタンパクであることを考慮すると⁷⁾、重鎖の酸化も抑制されたものと推察される。しかしながら、等尺性張力および 4-CmC 拘縮張力の改善は認められず、したがって、 T_3 の投与によるヒラメ筋の筋力低下には、筋原線維タンパクの酸化的修飾は大きく関与していないことが示唆される。我々は、ラットの横隔膜では、car が T_3 に起因する筋原線維タンパクの酸化および筋力低下を抑制することを観察している³³⁾。car の作用が、ヒラメ筋と横隔膜とで異なる原因についてはよく分からないが、筋線維組成の違い(ヒラメ筋—90~95% type I 線維, 横隔膜—14~17% type I 線維³⁴⁾)などが関与しているのかもしれない。

T_3 投与による筋原線維の機能の低下が、どのようなメカニズムで生じるかは明確ではなく、今後の課題である。心不全を発症した個体では、発症に伴い増加する循環性サイトカインが、骨格筋において筋原線維の収縮機能の低下を招来することが報告されている^{35,36)}。甲状腺機能亢進症のヒト³⁷⁾および実験動物³⁸⁾では、サイトカインの1つである tumor necrosis factor- α の血中での濃度が、著しく上昇す

ることが示されており、本研究で認められた筋原線維の機能の低下にも、サイトカインが関与している可能性が推察される。

本研究の結果から、 T_3 レベルの上昇によるヒラメ筋の筋力低下には、筋原線維の酸化的修飾は大きく関与しないことが示唆された。筋原線維の機能が低下するメカニズムについては、今後詳細に検討する必要がある。

V. 総 括

本研究の目的は、酸化ストレスが甲状腺ホルモン (T_3) の投与による筋力の低下に関与しているか否かを、抗酸化剤であるカルベディロール(car)を用いて検討することであった。Wistar 系雄性ラットを、1) 対照群, 2) T_3 投与群, 3) car 投与群, 4) T_3 および car 投与群の4群に分け、21日間の投薬後、摘出したヒラメ筋を分析に用い、以下の結果を得た。

1. T_3 の投与により、単収縮および強縮張力の低下とともに、4-chloro-*m*-cresol(4-CmC)誘因性の拘縮張力の低下が観察された。
2. T_3 の投与により、筋原線維タンパク質に含まれるカルボニル基の量が増加することが認められた。
3. car の投与により、 T_3 投与による筋原線維タンパク質の酸化は防止されたが、等尺性張力および 4-CmC 誘因性拘縮張力の低下は改善されなかった。

以上のことから、 T_3 の投与による筋力の低下は、筋原線維レベルにおける機能の低下に主に起因するが、筋原線維タンパク質の酸化的修飾はその主たる要因ではないことが示唆された。

(受理日 平成19年7月23日)

文 献

- 1) Ramsay, I. D. Muscle dysfunction in hyperthyroidism. *Lancet*, (1966), **2**, 931-934.
- 2) Nørrelund, H., Hove, K. Y., Brems-Dalgaard, E., Jurik, A. G., Nielsen, L. P., Nielsen, S., Jørgensen, J. O., Weeke, J. and Møller, N. Muscle mass and function in thyrotoxic patients before and during medical treatment. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, (1999), **51**, 693-699.
- 3) Zurcher, R. M., Horber, F. F., Grunig, B. E. and Frey, F. J. Effect of thyroid dysfunction on thigh muscle efficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (1989), **69**,

- 1082-1086.
- 4) Merican, Z. and Morat, P. Effects of thyroxine treatment on contractions of soleus muscles of anaesthetized cats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, (1984), **11**, 489-495.
 - 5) Zaiton, Z., Merican, Z., Khalid, B. A., Mohamed, J. B. and Baharom, S. The effects of propranolol on skeletal muscle contraction, lipid peroxidation products and antioxidant activity in experimental hyperthyroidism. *Gen. Pharmacol.*, (1993), **24**, 195-199.
 - 6) Yamada, T. and Wada, M. Effects of thyroid hormone on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and contractile properties in rat soleus muscle. *Jpn. J. Phys. Fitness. Sports. Med.*, (2004), **53**, 509-518.
 - 7) Yamada, T., Mishima, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M., Matsunaga, S. and Wada, M. Oxidation of myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. *J. Appl. Physiol.*, (2006), **100**, 1520-1526.
 - 8) Reid, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction : what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.*, (2001), **90**, 724-731.
 - 9) Andrade, F. H., Reid, M. B., Allen, D. G. and Westerblad, H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol. (Lond.)*, (1998), **509**, 565-575.
 - 10) Andrade, F. H., Reid, M. B. and Westerblad, H. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *Faseb. J.*, (2001), **15**, 309-311.
 - 11) Shindoh, C., DiMarco, A., Nethery, D. and Supinski, G. Effect of PEG-superoxide dismutase on the diaphragmatic response to endotoxin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, (1992), **145**, 1350-1354.
 - 12) Supinski, G. S. and Callahan, L. A. Diaphragmatic free radical generation increases in an animal model of heart failure. *J. Appl. Physiol.*, (2005), **99**, 1078-1084.
 - 13) Dalla Libera, L., Ravara, B., Gobbo, V., Danielli Betto, D., Germinario, E., Angelini, A. and Vescovo, G. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of Carvedilol. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, (2005), **38**, 803-807.
 - 14) Fernández, V., Tapia, G., Varela, P., Romanque, P., Cartier-Ugarte, D. and Videla, L. A. Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans : a comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, (2006), **142**, 231-239.
 - 15) Venditti, P. and Di Meo, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol. Life Sci.*, (2006), **63**, 414-434.
 - 16) Ward, C. W., Spangenburg, E. E., Diss, L. M. and Williams, J. H. Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and release rates. *Am. J. Physiol.*, (1998), **275**, R99-R104.
 - 17) Gollnick, P. D., Timson, B. F., Moore, R. L. and Riedy, M. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats. *J. Appl. Physiol.*, (1981), **50**, 936-943.
 - 18) Westerblad, H., Andrade, F. H. and Islam, M. S. Effects of ryanodine receptor agonist 4-chloro-*m*-cresol on myoplasmic free Ca²⁺ concentration and force of contraction in mouse skeletal muscle. *Cell Calcium*, (1998), **24**, 105-115.
 - 19) Ingalls, C. P., Warren, G. L., Williams, J. H., Ward, C. W. and Armstrong, R. B. E-C coupling failure in mouse EDL muscle after in vivo eccentric contractions. *J. Appl. Physiol.*, (1998), **85**, 58-67.
 - 20) Termin, A., Staron, R. S. and Pette, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, (1989), **92**, 453-457.
 - 21) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248-254.
 - 22) Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, (1990), **186**, 464-478.
 - 23) Yamada, T., Inashima, S., Matsunaga, S., Nara, I., Kajihara, H. and Wada, M. Different time course of changes in sarcoplasmic reticulum and myosin isoforms in rat soleus muscle at early stage of hyperthyroidism. *Acta Physiol. Scand.*, (2004), **180**, 79-87.
 - 24) Asayama, K., Dobashi, K., Hayashibe, H., Megata, Y. and Kato, K. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat : a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology*, (1987), **121**, 2112-2118.
 - 25) Asayama, K. and Kato, K. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radic. Biol. Med.*, (1990), **8**, 293-303.
 - 26) Venditti, P., Balestrieri, M., Di Meo, S. and De Leo, T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.*, (1997), **155**, 151-157.
 - 27) Davies, M. J. The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta*, (2005), **1703**, 93-109.
 - 28) Haycock, J. W., Jones, P., Harris, J. B. and Mantle, D. Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage : a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, (1996), **92**, 331-340.
 - 29) Haycock, J. W., Falkous, G. and Mantle, D. Differential susceptibility of skeletal muscle proteins to free

- radical-induced oxidative damage in vitro. In., Reznick, A. (ed.), *Oxidative stress in skeletal muscle*. Birkhauser, Basel, (1998), pp 157-176.
- 30) Zergeroglu, M. A., McKenzie, M. J., Shanely, R. A., Van Gammeren, D., DeRuisseau, K. C. and Powers, S. K. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J. Appl. Physiol.*, (2003), **95**, 1116-1124.
- 31) Moopanar, T. R. and Allen, D. G. The activity-induced reduction of myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in mouse skeletal muscle is reversed by dithiothreitol. *J. Physiol. (Lond.)*, (2006), **571**, 191-200.
- 32) Lowe, D. A., Surek, J. T., Thomas, D. D. and Thompson, L. V. Electron paramagnetic resonance reveals age-related myosin structural changes in rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.*, (2001), **280**, C540-C547.
- 33) Yamada, T., Mishima, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M., Matsunaga, S. and Wada, M. Myofibrillar protein oxidation and contractile dysfunction in hyperthyroid rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.*, (2007), **102**, 1850-1855.
- 34) Pette, D. and Staron, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, (1990), **116**, 1-76.
- 35) Reid, M. B. and Li, Y. P. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, (2001), **171**, 225-232.
- 36) Li, X., Moody, M. R., Engel, D., Walker, S., Clubb, F. J. Jr., Sivasubramanian, N., Mann, D. L. and Reid, M. B. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor α causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation*, (2000), **102**, 1690-1696.
- 37) Senturk, T., Kozaci, L. D., Kok, F., Kadikoylu, G. and Bolaman, Z. Proinflammatory cytokine levels in hyperthyroidism. *Clin. Invest. Med.*, (2003), **26**, 58-63.
- 38) Fernández, V., Videla, L. A., Tapia, G. and Israel, Y. Increases in tumor necrosis factor α in response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic. Res.*, (2002), **36**, 719-725.