

<https://doi.org/10.3176/biol.1984.3.03>

УДК 57.017.645:577.174.444:591.175.7

Юри ВАЙГА, Сийри ВАЙГА

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЦЫПЛЯТ ПРИ ВВЕДЕНИИ ТИРОКСИНА

В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении молекулярного механизма действия гормона щитовидной железы при регуляции множества процессов как чисто метаболических, так и связанных с дифференцировкой. Выяснено влияние тироксина (T_4) на разные субъединицы клетки-мишени, приводящее к стимуляции биосинтеза путем изменения состава транскрибируемых РНК (Tata, 1971). Эти физиологические эффекты дает проникновение гормона как низкомолекулярного вещества в клеточное ядро, где образуется комплекс с рецепторным белком хроматина. В результате этой интеракции активируются некоторые новые области ДНК (Oppenheimer и др., 1974; Charles и др., 1975). Менее изучены вопросы регуляции состава синтезируемых белков.

Особый интерес представляет процесс дифференцировки мышечной ткани, характеризующийся повышенным уровнем аккумуляции тканеспецифических белков, что обеспечивает завершение формирования миофибрилл (Иванов и др., 1959; Dickerson, 1960; Hergmann и др., 1970). Начало и объем синтеза белка определяются чувствительностью ткани к тиреоидным гормонам и уровнем функциональной активности щитовидной железы, который, например, у цыплят после вылупления составляет 20 мкг T_4 на 1 кг массы тела в день (Tanabe и др., 1965) и снижается в ходе онтогенеза. Исходя из вышеизложенного, существенным показателем процессов дифференцировки мышечной ткани считается количество нуклеиновых кислот как непосредственных продуктов гормональной регуляции. В литературе по этому вопросу имеются разные данные — отмечают постоянное снижение доли нуклеиновых кислот в мышечной ткани за счет увеличения содержания белков (Robinson, 1952); а по данным других авторов (Савронь и др., 1966), концентрация нуклеиновых кислот повышается в период интенсивного роста ткани. По скорости накопления тканеспецифических белков постнатальный онтогенез грудной мышцы цыплят-бройлеров можно разделить на две стадии, причем непосредственно после вылупления цыплят синтез миофибриллярных белков достигает наивысших показателей (Вайга, 1977). Одной из причин повышенной аккумуляции тканеспецифических белков в мышечной ткани может служить рост функциональной активности щитовидной железы. Для подтверждения такой зависимости нами определена динамика содержания нуклеиновых кислот в грудной и икроножной мышцах цыплят-бройлеров. Кроме того, изучалось воздействие однократных доз T_4 на содержание и Ca^{2+} -АТФазную активность свежесинтезируемых миофибриллярных белков.

Материал и методика

Для определения содержания нуклеиновых кислот свежие образцы ткани грудной и икроножной мышц (~0,2 г) гибридных цыплят кросса «Балтика-6» измельчали в растворе 0,2М HClO₄ в соотношении 1 : 10 при температуре 0—4 °С. Очистку и экстракцию нуклеиновых кислот проводили стандартным гидролизом по методу Шмидта—Таннхаузера. Содержание ДНК, РНК и сумму нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически по методу А. С. Спирина (1958).

Для изучения влияния гормона цыплятам однократно было введено подкожно 20, 40 или 100 мкг Т₄ на 1 кг массы тела. L-тироксин фирмы «Реанал» растворяли в физиологическом растворе при рН 8,0. Контрольным цыплятам вводили 0,5 мл физиологического раствора. Материал для анализов выделяли и гомогенизировали по ранее описанной нами методике (Вайга, 1977). Тканеспецифические белки фракционировали количественно по методу И. И. Иванова (1959), используя весовое соотношение навески и объема раствора Вебера 1 : 20. Концентрацию белка определяли по методу Р. Ф. Ицаки и Д. М. Джилл (Itzhaki, Gill, 1964), а Са²⁺-АТФазную активность — рН-статически по нарастанию в среде инкубации концентрации водородных ионов (Болдырев и др., 1969). Использовали рН-стат, сконструированный на основе комплекта титровального оборудования «Т-106». Реакцию проводили при температуре 37° с учетом поправки фона СО₂. Состав инкубационной среды: 25 мМ КСl; 4,0 мМ СаСl₂; 2,3 мМ АТФ; 0,3 мг белка на 1 мл среды, рН 8,2.

Результаты и обсуждение

Возрастная динамика содержания нуклеиновых кислот в грудной и икроножной мышцах представлена в табл. 1. Суммарное содержание нуклеиновых кислот в грудной мышце возрастает и достигает максимального значения $6,68 \pm 0,25$ мг на 1 г ткани; ($P < 0,01$) к пятому дню постнатального онтогенеза, что в среднем на 73% превышает соответствующий показатель у свежевывлупившейся особи. После отмеченного роста концентрация нуклеиновых кислот снижается до $3,10 \pm 0,17$ мг на 1 г ткани к концу периода наблюдения (30-й день). Максимум этой динамики достигается главным образом за счет РНК, так как их содержание за 5 дней постнатальной жизни увеличивается от $2,13 \pm 0,12$ до $4,22 \pm 0,11$ мг на 1 г ткани ($P < 0,01$), что составляет в среднем 98% прироста по сравнению с начальным уровнем. В концентрации ДНК в грудной мышце

Таблица 1

Динамика содержания нуклеиновых кислот в грудной (гр) и икроножной (икр) мышцах цыплят-бройлеров в ранний постнатальный период

| Возраст, дни | Содержание нуклеиновых кислот в ткани, мг на 1 г ткани | | | | | |
|--------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | гр РНК | икр РНК | гр ДНК | икр ДНК | гр НК | икр НК |
| 1 | $2,13 \pm 0,12$ | $2,99 \pm 0,17$ | $1,70 \pm 0,11$ | $1,40 \pm 0,13$ | $3,86 \pm 0,14$ | $4,22 \pm 0,10$ |
| 3 | $3,28 \pm 0,14$ | $2,78 \pm 0,06$ | $2,31 \pm 0,19$ | $1,30 \pm 0,06$ | $5,70 \pm 0,22$ | $3,84 \pm 0,07$ |
| 5 | $4,22 \pm 0,11$ | $2,34 \pm 0,04$ | $2,30 \pm 0,22$ | $1,22 \pm 0,11$ | $6,68 \pm 0,25$ | $3,50 \pm 0,24$ |
| 7 | $4,16 \pm 0,12$ | $2,35 \pm 0,04$ | $2,18 \pm 0,23$ | $1,14 \pm 0,06$ | $6,13 \pm 0,35$ | $3,34 \pm 0,03$ |
| 10 | $3,93 \pm 0,21$ | $2,55 \pm 0,11$ | $1,77 \pm 0,09$ | $1,32 \pm 0,06$ | $5,64 \pm 0,49$ | $3,76 \pm 0,30$ |
| 14 | $3,50 \pm 0,19$ | $2,13 \pm 0,15$ | $1,51 \pm 0,10$ | $0,94 \pm 0,04$ | $5,10 \pm 0,30$ | $3,33 \pm 0,04$ |
| 20 | $2,37 \pm 0,11$ | $2,04 \pm 0,07$ | $1,17 \pm 0,16$ | $0,89 \pm 0,06$ | $3,37 \pm 0,22$ | $3,05 \pm 0,10$ |
| 30 | $2,01 \pm 0,11$ | $1,89 \pm 0,07$ | $1,24 \pm 0,14$ | $0,90 \pm 0,05$ | $3,10 \pm 0,17$ | $2,82 \pm 0,09$ |

обнаруживается тоже некоторое, хотя и статистически недостоверное, повышение. Характер динамики содержания нуклеиновых кислот в икроножной мышце совершенно иной (табл. 1). В течение первых 30 дней концентрация РНК постоянно снижается с $2,99 \pm 0,17$ до $1,89 \pm 0,07$, а ДНК с $1,40 \pm 0,13$ до $0,90 \pm 0,05$ мг на 1 г ($P < 0,01$).

Приведенные данные свидетельствуют о разнонаправленности возрастных динамик содержания нуклеиновых кислот в грудной и икроножной мышцах в ранний постнатальный период онтогенеза. Напомним, что именно в этот период скорость накопления тканеспецифических белков в грудной мышце достигает наивысших показателей (Вайга, 1977). Согласно данным других авторов (Dickerson, 1960; Савронь и др., 1966), аккумуляция тканеспецифических белков в грудной мышце цыплят происходит по ходу миогенеза крайне постепенно. Вероятно, установленный нами в грудной мышечной ткани синтез дополнительной РНК, которая по своей природе рибосомальна, является непосредственным результатом гормональной индукции развития ткани. В таком случае допустимо, что грудная мышца наряду с миокардом (Oppenheimer и др., 1974) и в отличие от икроножной мышцы обладает чувствительностью к гормонам щитовидной железы в этом кратком периоде миогенеза. При наличии такой гормональной индукции можно ожидать регуляции темпа синтеза тканеспецифических белков тиреоидными гормонами.

Таблица 2

Влияние однократной дозы тироксина на Ca^{2+} -АТФазную активность и содержание тканеспецифических белков (ТСБ) в грудной мышце цыплят на разных стадиях онтогенеза

| Возраст, дни | Время после введения T_4 , ч | Исходный уровень | | Доза тироксина, мкг/кг | | | | | |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Содержания ТСБ, мг белка на 1г ткани | АТФазной активности, мкМ H^+ мг белка $^{-1}$ мин $^{-1}$ | 20 | | 40 | | 100 | |
| | | | | Разница от исходного уровня, % | | | | | |
| | | | | ТСБ | АТФаза | ТСБ | АТФаза | ТСБ | АТФаза |
| 1 | 24 | $20,7 \pm 2,4$ | $0,52 \pm 0,12$ | -16,8* | -6,2 | -1,5 | -0,1 | +8,5 | +3,1 |
| | 48 | $38,0 \pm 4,7$ | $1,33 \pm 0,19$ | -43,4* | -0,2 | -2,1 | -11,1 | -9,0 | -21,4* |
| 6 | 24 | $78,7 \pm 4,5$ | $2,36 \pm 0,21$ | +25,0* | -3,5 | +14,0* | -35,6* | +5,0 | -34,6* |
| | 48 | $76,9 \pm 7,2$ | $1,46 \pm 0,26$ | +23,9* | -11,1 | +29,2* | +57,1* | +25,5* | +30,0* |
| 20 | 24 | $66,8 \pm 7,0$ | $1,94 \pm 0,20$ | +16,2* | -8,6 | +14,6* | -16,3* | +25,8* | -14,2* |
| | 48 | $67,4 \pm 4,8$ | $1,42 \pm 0,13$ | +10,2* | -4,9 | +11,8* | +30,8* | +26,5* | +34,1* |

* Статистически значимые отличия от контроля ($P < 0,05$); Число опытов ≥ 4 .

Мы изучили влияние однократных доз T_4 — 20, 40 или 100 мкг на 1 кг массы тела — на содержание тканеспецифических белков и их Ca^{2+} -АТФазную активность в разные возрастные периоды цыплят через 24 и 48 ч после введения гормона (табл. 2). Содержание тканеспецифических белков в грудной мышце наиболее зависит от гормона при дозе 20 мкг/кг массы тела. У однодневных цыплят эта доза независимо от продолжительности воздействия, вызывает снижение содержания тканеспецифических белков на 16,8—43,4% в отличие от уровня контрольной группы. Далее (на 6-й и 20-й день) наблюдается некоторое увеличение концентрации тканеспецифических белков — от 10,2 до 25,0%. Более высокие дозы T_4 вызвали статистически достоверное увеличение содержания тка-

неспецифических белков грудной мышцы 6- и 20-дневных цыплят --- от 14,0 до 29,2% (табл. 2). Разумеется, установленные изменения выхода тканеспецифических белков могут служить только косвенной мерой изменения скорости аккумуляции белка миофибрилл мышечного волокна, поскольку экстрагируемым не все белки выделяются количественно. Но свежесинтезируемые миофибрилярные белки, как известно, сравнительно легко переходят в растворы нейтральных солей высокой ионной силы, так как они слабо связаны с миофибриллами (Etlinger и др., 1975; Васильева и др., 1976).

У однодневных цыплят используемые дозы гормона не вызвали статистически достоверных изменений Ca^{2+} -АТФазной активности тканеспецифических белков (табл. 2). У 6- и 20-дневных цыплят наблюдается разнонаправленность эффекта T_4 в зависимости от продолжительности воздействия при дозах 40 и 100 мкг/кг. Через 24 ч удельная энзиматическая активность снижается (14,2—35,6%), а через 48 ч повышается (30,0—57,1%). Зависимость действия гормона от продолжительности влияния объясняется, очевидно, наличием нескольких источников Ca^{2+} -АТФазной активности в изучаемых растворах. В первом случае (через 24 ч) экстрагируются тканеспецифические белки, в соотношении миозина и актомиозина которых превалирует миозин, обладающий более низкой удельной энзиматической активностью, а во втором (через 48 ч) — актомиозин.

Полученные результаты выявляют значительные различия в реакции грудной мышечной ткани на воздействие однократных доз экзогенного T_4 в зависимости от возраста особи. Нетрудно заметить, что характер обнаруженных сдвигов выхода и удельной Ca^{2+} -АТФазной активности тканеспецифических белков зависит от направленности возрастной динамики содержания нуклеиновых кислот в ткани: во время интенсивной аккумуляции последних мышечная ткань не реагирует на экзогенный T_4 , а по истечению этой интенсивной фазы обмена нуклеиновых кислот выявляется зависимость содержания и энзиматической активности тканеспецифических белков от дозы и продолжительности воздействия гормона. Полученные данные трудно сравнить с результатами других авторов (Yazaki, Raben, 1975; Morkin и др., 1977), применявших более длительные воздействия (до 3 недель) тироксином, что вызывало изменения первичной структуры белка, т. е. образование новой изоформы миозина. Использование доз гормона, приблизительно равных суточной секреции щитовидной железы, приводит к повышению эндогенного фона гормона, к росту содержания нуклеиновых кислот и к стимуляции скорости синтеза тканеспецифических белков в мышечных волокнах.

ЛИТЕРАТУРА

- Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. О методе одновременной регистрации аденозинтрифосфатазных и Са-насыщающих свойств фрагментов саркоплазматического ретикулума. — *Вопр. мед. химии*, 1969, 34, 119—124.
- Вайга Ю. Постнатальная динамика содержания и фракционного состава сократительных белков грудной мышцы цыплят. — *Изв. АН ЭССР. Биология*, 1977, 26, 243—246.
- Васильева В. В., Лапина Л. Ф., Ушаков В. Б. Экстрагируемость и фракционный состав сократительных белков из фазных и тонических мышечных волокон лягушки. — В кн.: *Биофизика и биохимия мышечного сокращения*. М., 1976, 40—43.
- Иванов И. И., Жахова З. Н., Зиновьева И. П., Минович Н. И., Моисеева В. П., Паршина Э. А., Тукачинский С. Е., Юрьев В. А. Фракционный состав белков и сократительная функция мышц различных типов. — *Биохимия*, 1959, 24, 451—458.

- Савронь Е. С., Четкин А. В., Лутай С. М. Обмен белков и нуклеиновых кислот в тканях кур в связи с возрастом и физиологическим состоянием организма. — В кн.: Биохимия высокой продуктивности животных. М., 1966, 159—175.
- Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. — Биохимия, 1958, 23, 159—175.
- Charles, M. A., Ruffel, G. U., Obinata, M., McCarty, B. J., Baxter, I. D. Nuclear receptors for thyroid hormone. Evidence for nonrandom distribution within chromatin. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 1787—1791.
- Dickerson, J. W. T. The effect of growth of the composition of avian muscle. — Biochem. J., 1960, 75, 33—37.
- Etlinger, J. D., Zak, R., Fischmann, D. A., Rabinowitz, M. Isolation of newly synthesised myosin filaments from skeletal muscles homogenates and myofibrils. — Nature, 1975, 255, 259—261.
- Herrmann, H., Heywood, S. M., Marchok, A. C. Reconstruction of muscle development as a sequence of macromolecular synthesis. — In: Current Topics in Developmental Biology. New York—London, 1970, 5, 181—234.
- Izhaki, R. F., Gill, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. — Anal. Biochem., 1964, 9, 401—410.
- Morkin, E., Banerjee, S. K., Stern, L. Z. Biochemical and histochemical evidence for stimulation of myosin ATPase activity in thyrotoxic rabbit heart. — FEBS Lett., 1977, 79, 357—360.
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. J., Surks, M. J. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. — Endocrinology, 1974, 96, 897—903.
- Robinson, D. S. Changes in the nucleoprotein content of chick muscle during development. — Biochem. J., 1952, 52, 628—633.
- Tanabe, Y., Komiyama, T., Kubota, D., Tamaki, Y. Comparison of the effect of thiouracil, propylthiouracil and methimazole on J^{131} metabolism by the chick thyroid and measurements of the thyroxine secretion rates. — Gen. Comp. Endocrinol., 1965, 5, 60—68.
- Tata, J. R. Cell structure and biosynthesis during hormone-mediated growth and development. — In: Hormones in Development. New York, 1971, 1, 19—41.
- Yazaki, Y. Y., Raben, M. S. Effect of the thyroid state on the enzymatic characteristics of the cardiac myosin. A difference in behaviour of rat and rabbit cardiac myosin. — Circulat. Res., 1975, 36, 208—215.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
13/VII 1983

Jüri VAIGA, Siiri VAIGA

БИОКЕЕМИЛИСЕД МУУТУСЕД ТИБУДЕ СКЕЛЕТИЛИХАСТЕС ТÜРОКСИИНИ ТОИМЕЛ

Artiklis on esitatud broilertibude rinna- ja jalalihase nukleiinhapete sisalduse dünaamika postnataalsel perioodil. Tähelestatud RNA sisalduse olulist tõusu rinnalihases koorumisjärgse 5 päeva jooksul seostati kilpnäärme funktsionaalse aktiivsuse suurenemisega. On käsitletud türoksiini ühekordsete dooside (20, 40 või 100 mkg/kg) tekitatud muutusi rinnalihase koepetsiifiliste valkude sisalduses ja Ca^{2+} -ATPaasses aktiivsuses. Katsetest nähtub, et nimetatud muutused sõltuvad tibu east ja hormooni toime kestusest.

**BIOCHEMICAL CHANGES OF CHICK SKELETAL MUSCLES
AFTER THYROXINE INJECTION**

The age dynamics of the nucleic acid content of chick's breast and leg muscle has been observed during the postnatal period of development. RNA content in the breast muscle attains the maximum level on the 5th day after hatching. It is supposed that this is directly induced by thyroid hormones. To prove that hypothesis, temperate hyperthyroidism was produced in chicks by an injection of 20, 40 or 100 mkg thyroxine per kg body weight. The results show that during RNA accumulation neither the content of tissue specific proteins nor their Ca^{2+} -ATPase activity can be influenced by hyperthyroidism. On the contrary, after that period the administration of the hormone increases the yield of tissue specific proteins and results in shifts of their enzymatic activity.