

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organizmů



Eva Kyclerová

Úloha oxidačního stresu v kardioprotekci vyvolané tělesným cvičením.

Role of oxidative stress in cardioprotection induced by exercise.

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2013

Poděkování:

Chtěla bych velice poděkovat své školitelce doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za její vstřícný přístup a cenné rady, které mi věnovala ohledně psaní bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala celé své rodině a příteli Jakobovi, kteří mi pomáhali a podporovali mě.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2013

.....

Podpis

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Je známo, že srdeční sval může jako odpověď na stres aktivovat endogenní protektivní dráhy, a tak zvýšit odolnost před ischemicko/reperfúzním (I/R) poškozením. Protektivní dráhy zahrnují celou řadu signálních molekul a důležitou úlohu zde hrají reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS se uplatňují v kardioprotekci vyvolané po různých stimulech, jako je chronická hypoxie, preconditioning a také tělesné cvičení. Bylo prokázáno, že pravidelné tělesné cvičení vede k pozitivní adaptaci, která přirozeným způsobem chrání srdce před poškozením. Pro správné fungování srdce je důležitá vyvážená tvorba ROS a jejich odstraňování prostřednictvím antioxidačního ochranného systému. Za patologických stavů, jako je I/R, dochází k nadprodukci ROS, tedy k oxidačnímu stresu, který se na poškození srdce podílí. ROS však nemusí přispívat jen k poškození, v mírných koncentracích, vznikajících například během tělesného cvičení, jsou důležitými signálními molekulami podílejícími se na stimulaci řady dějů vedoucích ke kardioprotekci. Mírně zvýšený oxidační stres chrání srdce tak, že zvyšuje kapacitu antioxidační ochrany, stimuluje angiogenezi, aktivuje biogenezi mitochondrií a fyziologickou hypertrofii. Prozkoumání přesné role ROS v ochraně srdce vyvolané tělesným cvičením by mohlo vést ke zlepšení prevence a léčby kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova:

srdce, kardioprotekce, buněčná signalizace, oxidační stres, ischemicko/reperfúzní poškození, cvičení

Abstract

Cardiovascular diseases are the major cause of death in developed countries. It is known that heart muscle can activate endogenous protective pathways in response to stress, thereby increasing resistance against ischemia/reperfusion (I/R) injury. Protective pathways involve many signaling molecules and reactive oxygen species (ROS) play an important role among them. ROS are applied in cardioprotection induced by various stimuli, such as chronic hypoxia, preconditioning and also physical exercise. It has been demonstrated that regular physical exercise naturally leads to the positive adaptation to protect heart against injury. The balance between production of ROS and their removal by antioxidant protection system is important for the right functioning of the heart. The overproduction of ROS occurs in pathological conditions such as an I/R leading to oxidative stress contributing to subsequent damage of heart. ROS may contribute not only to the injury but in the mild concentrations, resulting for example from physical exercise, ROS are important signaling molecules involved in series of events leading to cardioprotection. Slightly increased oxidative stress protects the heart by increasing the capacity of antioxidant system, stimulates angiogenesis, activates mitochondrial biogenesis and physiological hypertrophy. Exploring the precise role of ROS in the protection of heart induced by physical exercise could lead to improved prevention and treatment of cardiovascular diseases.

Key words:

heart, cardioprotection, cell signaling, oxidative stress, ischemia/reperfusion injury, exercise

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
ÚVOD.....	9
1 TĚLESNÉ CVIČENÍ	10
1.1 INTENZITA CVIČENÍ	10
1.1.1 Aerobní cvičení	10
1.1.2 Anaerobní cvičení	10
1.2 FREKVENCE CVIČENÍ.....	10
1.2.1 Akutní cvičení.....	10
1.2.2 Chronické cvičení.....	10
1.3 DRUHY SVALOVÉ KONTRAKCE PŘI CVIČENÍ.....	11
1.3.1 Koncentrická svalová kontrakce	11
1.3.2 Izometrická svalová kontrakce	11
1.3.3 Excentrická svalová kontrakce.....	11
2 OXIDAČNÍ STRES A ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM	12
2.1 OXIDAČNÍ STRES.....	12
2.2 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	12
2.2.1 Radikálové ROS.....	12
2.2.1.1 Superoxidový aniont.....	12
2.2.1.2 Hydroxylový radikál	13
2.2.1.3 Peroxylový radikál	13
2.2.2 Neradikálové ROS	13
2.2.2.1 Peroxid vodíku	13
2.2.2.2 Singletový kyslík.....	13
2.3 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	14
2.4 PRODUKCE ROS A RNS.....	14
2.4.1 Mitochondrie.....	14
2.4.2 NADPH oxidáza	15
2.4.3 Xantinoxidáza	16
2.4.4 Cytochrom P450	16
2.4.5 Syntáza oxidu dusnatého.....	17

2.5	ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÝ SYSTÉM.....	17
2.5.1	Enzymatické antioxidanty.....	17
2.5.1.1	Superoxiddizmutázy	17
2.5.1.2	Peroxiredoxiny.....	18
2.5.1.3	Glutationperoxidázy	18
2.5.1.4	Glutationtransferázy.....	19
2.5.1.5	Kataláza	19
2.5.2	Neenzymatické antioxidanty	19
2.5.2.1	Vysokomolekulární antioxidanty	19
2.5.2.2	Nízkomolekulární antioxidanty.....	20
2.5.3	Vztahy mezi antioxidanty	20
3	ÚLOHA OXIDAČNÍHO STRESU PŘI CVIČENÍ	22
3.1	MECHANIZMUS ENDOGENNÍ KARDIOPROTEKCE	22
3.2	MOŽNOSTI JAK VYVOLAT ENDOGENNÍ KARDIOPROTEKCI	23
3.3	KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY TĚLESNÉHO CVIČENÍ - ÚLOHA ROS.....	24
3.3.1	Zvýšená aktivita antioxidačních enzymů a množství neenzymových antioxidantů	24
3.3.2	Stimulace angiogeneze	26
3.3.3	Zvýšená biogeneze mitochondrií.....	28
3.3.4	Hypertrofie svalů	30
	ZÁVĚR.....	32
	POUŽITÁ LITERATURA.....	33

Seznam použitých zkratek

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
Akt	proteinkináza B
AMP	adenozin-5'-monofosfát
AMPK	adenozinmonofosfátkináza
ATP	adenozin-5'-trifosfát
CaMKIV	proteinkináza IV závislá na Ca^{2+} a kalmodulinu
cGPx	cytozolická GSH-glutationperoxidáza
cNOS	konstitutivní syntázy oxidu dusnatého
DNA	kyselina deoxyribonukleová
ERR- α	receptor α spojený s estrogenem (estrogen-related receptor α)
FAD	oxidovaný flavinadenindinukleotid
FADH ₂	redukovaný flavinadenindinukleotid
GPx	glutationperoxidáza
GS ⁻	redukovaný glutation v disociovaném stavu
GS [·]	glutatioylový radikál
GSH	redukovaný glutation
GSSG	oxidovaný glutation (glutationdisulfid)
GSSG ⁻	radikál oxidovaného glutationu
GST	glutationtransferáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF- β)	transkripční faktory vyvolané hypoxií
I/R	ischemicko/reperfúzní
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor-1
IGF-1R	receptor pro IGF-1
IKK	I κ B kináza
IL-6, IL-15	interleukin-6, interleukin-15
IPC	ischemický preconditioning
I κ B	inhibitor NF- κ B
koenzym Q (oxidovaný)	ubichinon
koenzym Q (redukovaný)	ubichinol
LIF	faktor inhibující leukemii (leukemia inhibitory factor)
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkináza
MMPs	metaloproteázy
mtDNA	mitochondriální DNA
mtTFA	mitochondriální transkripční faktor A
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF- κ B	jaderný transkripční faktor κ B
NO [·]	oxid dusnatý
NOS	syntázy oxidu dusnatého
NOS I (nNOS)	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NOS II (iNOS)	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
NOS III (eNOS)	endotelová syntáza oxidu dusnatého

NRF (NRF-1, NRF-2)	jaderný respirační faktor (nuclear respiratory factor)
$O_2^{\cdot -}$	superoxidový aniont
OH \cdot	hydroxylový radikál
ONOO $^-$	peroxynitrit
PGC-1 α	peroxizomální proliferací aktivovaný receptor gamma koaktivátor 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α)
PHGPx	fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza
PI3K	fosfatidylinositol-3' kináza
Prxs	peroxiredoxiny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acid)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROO \cdot	peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SOD	superoxiddizmutáza
SOD1 (Cu,ZnSOD)	měď, zinková SOD
SOD2 (MnSOD)	manganová SOD
SOD3 (ecSOD)	extracelulární SOD
SWOP	druhé okno protekce (second window of protection)
Trx	tioredoxin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR2	VEGF-receptor-2
XDH	xantindehydrogenáza
XO	xantinoxidáza
XOR	xantinoxidoreduktázy

Úvod

Srdce má schopnost adaptovat se na stres tak, že jsou stimulovány endogenní protektivní signální dráhy, což vede k jeho ochraně před ischemicko-reperfúzním (I/R) poškozením. I/R poškození se skládá ze dvou následných fází - ischemie a reperfúze. Ischemie je nedostatečné prokrvení srdeční tkáně, k němuž dochází v důsledku neprůchodnosti cév. Zejména při opětovném obnovení průtoku krve, tzv. reperfúzi, dochází k velké produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species), což může vést k oxidačnímu stresu. Oxidační stres vzniká nerovnováhou mezi produkcí ROS a jejich odstraňováním pomocí antioxidantního ochranného systému a je jednou z příčin závažných onemocnění, například kardiovaskulárních. Je nutné zdůraznit, že ROS nemusí vždy přispívat jen k patologickým stavům, v mírných koncentracích jsou totiž důležité pro stimulaci různých fyziologických dějů, jako je imunitní ochrana, syntéza signálních molekul a také stimulace signálních drah vedoucích ke kardioprotekci.

Mezi I/R poškození patří infarkt myokardu, kontraktální dysfunkce a arytmie. V současné době je známa celá řada možností, jak zvýšit odolnost srdce před I/R poškozením. Kardioprotektivní účinky byly pozorovány po preconditioningu, postconditioningu, adaptaci na chronickou hypoxii, podání různých farmak a tělesném cvičení. Mezi zmíněnými protektivními stimuly je především tělesné cvičení přirozeným, a zároveň trvale udržitelným způsobem, jak poskytnout srdci ochranu. Pravidelné tělesné cvičení chrání srdce nejen před I/R poškozením, ale výrazně snižuje riziko úmrtí v následné péči po infarktu myokardu.

Mechanismus endogenní kardioprotekce ještě není zcela objasněn, ale mnohé studie potvrzují, že se v něm významně uplatňují signální molekuly, mezi něž patří i ROS. Studie, které se zabývají kardioprotektivním účinkem tělesného cvičení, prokázaly, že ROS jsou zahrnuty v celé řadě aspektů, které zlepšují funkci srdce. Řadí se mezi ně zvýšená kapacita antioxidantní ochrany, stimulace angiogeneze, zvýšená biogeneze mitochondrií zajišťující zvýšenou dodávku energie a fyziologická hypertrofie svalů.

Předmětem dalšího výzkumu zůstává, které buněčné mediátory jsou požadovány pro dosažení maximálních výhod ze cvičením vyvolané kardioprotekce, a jaká je přesná role ROS v mechanismu ochrany srdce. Podrobné prozkoumání těchto mechanismů by mohlo vést k rozvoji molekulárních nebo farmakologických postupů v prevenci a léčbě I/R poškození. Primárním patologickým projevem kardiovaskulárních onemocnění, která jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích, je poškození srdce v důsledku působení I/R. Proto je věnována velká pozornost výzkumu právě v této oblasti.

1 Tělesné cvičení

Cvičení je možné definovat jako plánovanou a strukturovanou činnost kosterního svalstva, která vede ke zvýšení energetického výdeje a srdeční frekvence (Thompson et al., 2003). Cvičení lze rozdělit podle různých kritérií, například podle intenzity (aerobní a anaerobní), frekvence (akutní a chronická) nebo svalové kontrakce (koncentrická, izometrická a excentrická) (Gomes et al., 2012).

1.1 Intenzita cvičení

1.1.1 Aerobní cvičení

Při fyzické námaze aerobního typu využívá organismus aerobní metabolismus, který nejdříve spotřebovává energii z tuků. Energii produkuje za využití kyslíku, takže v krvi nedochází k hromadění kyseliny mléčné. Toto cvičení bývá spíše vytrvalostní. Patří sem jogging, kondiční plavání, vytrvalostní běh nebo silniční cyklistika.

1.1.2 Anaerobní cvičení

Anaerobní cvičení bývá charakterizováno jako krátké období vysokého úsilí. Energie je generována z glykogenu bez použití kyslíku, což má za následek hromadění kyseliny mléčné v krvi. Mezi anaerobní cvičení se řadí dlouhé skoky, sprinty (běh, plavání, jízda na kole) nebo jakýkoliv druh tělesné zátěže, který trvá méně než dvě minuty.

1.2 Frekvence cvičení

1.2.1 Akutní cvičení

Jako akutní cvičení mohou být charakterizovány jednotlivé zátěže, které jsou nepravidelné. Toto cvičení generuje dočasnou metabolickou a kardiovaskulární reakci organismu, která může trvat od několika minut až po několik hodin.

1.2.2 Chronické cvičení

Chronické cvičení je opakované úsilí, při kterém dochází k navození trénované odpovědi organismu. Při chronickém cvičení dochází k fyziologickým a metabolickým adaptacím, které jsou viditelné a dlouhotrvající.

1.3 Druhy svalové kontrakce při cvičení

Svalová kontrakce nastává tehdy, když centrální nervový systém přenáší signál do svalových vláken. Při dostatku energie a dostupnosti vápníku vytváří svalová vlákna napětí, což může vést ke zkracování nebo prodlužování svalů.

1.3.1 Koncentrická svalová kontrakce

Koncentrická neboli soustředná svalová kontrakce vede ke zkrácení svalu za produkce síly. Při koncentrické kontrakci se dva konce svalu pohybují blíže k sobě, uzavírají se a zkracují. K tomu dochází, pokud síla vytvářená svalem přesáhne zatížení proti jeho kontrakci. Typickým příkladem koncentrické svalové kontrakce je zvednutí činky.

1.3.2 Izometrická svalová kontrakce

Izometrická svalová kontrakce je vlastně statická, nedochází při ní k pohybu, ani ke změně délky svalu. Dochází však ke zvýšení napětí ve svalu. Příklad izometrické svalové kontrakce je držení činky v pokrčené ruce, kdy nedochází k pohybu kloubu.

1.3.3 Excentrická svalová kontrakce

Excentrická svalová kontrakce odpovídá natažení svalu ze soustředné nebo statické polohy. Příkladem může být strečink, kdy dochází k pozvolnému a dlouhotrvajícímu protahování, nebo zvedání činek, kdy při pohybu ruky s činkou směrem dolů dochází k rychlému natažení svalu.

2 Oxidační stres a antioxidační systém

2.1 Oxidační stres

Oxidační stres je nerovnováha mezi produkcí ROS a reaktivních forem dusíku (RNS, reactive nitrogen species) a jejich odstraňováním. Vzniká nadprodukcí ROS a RNS nebo snížením hladiny antioxidantů, což může být způsobeno jejich vyčerpáním či nízkou produkcí. K oxidačnímu stresu může docházet také kombinací předchozích možností. Buňky většinou tolerují mírný oxidační stres, což vede ke kardioprotektivnímu účinku. Ve větším množství se uplatňují ROS při vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Mírný oxidační stres, například vlivem cvičení, však může vést k pozitivní adaptaci vedoucí ke zvýšené odolnosti srdce.

2.2 Reaktivní formy kyslíku

ROS a RNS mají značný fyziologický význam. Účastní se imunitní ochrany, přenosu energie a buněčných regulací.

Molekulární kyslík obsahuje dva ne zcela plně obsazené orbitály, tudíž je označován jako biradikál. Podle počtu přijatých elektronů vznikají jeho různé reaktivní formy. ROS rozdělujeme na radikálové a neradikálové. Rozdíl je v uspořádání elektronů v orbitalech. Volný radikál obsahuje alespoň jeden orbital s jedním nepárovým elektronem, čímž se stává velice reaktivní. Většina biomolekul obsahuje orbitály plně obsazené dvěma elektrony, tudíž nejsou označovány jako radikály.

2.2.1 Radikálové ROS

2.2.1.1 Superoxidový aniont

Podle elektronové konfigurace je superoxidový aniont (O_2^-) zároveň radikál i aniont. Jeho záporný náboj zapříčiňuje to, že nemůže procházet přes membrány. Má však schopnost peroxidovat lipidy, a tím membrány narušovat. Přijmutím jednoho elektronu se kyslík redukuje na O_2^- . V organismu takto vzniká nejčastěji v mitochondriálním elektron-transportním řetězci. O_2^- podléhá reakci zvané dizmutace, která může ve vodném prostředí probíhat vysokou rychlostí i bez přítomnosti katalyzátoru. V organismu je k větší účinnosti této reakce využíván enzym superoxidodizmutáza (SOD) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2.2.1.2 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál (OH \cdot) vzniká Haberovou-Weissovou reakcí z peroxidu vodíku (H₂O₂) a O₂ \cdot^- . Tato reakce je katalyzována přechodnými kovy (Cu, měď; Fe, železo). V živých organizmech je železo uchováváno v přenašečových proteinech feritinu a transferinu, měď je uchovávána v ceruloplazminu. Kovy mohou být z těchto přenašečů uvolněny pomocí O₂ \cdot^- . Pokud je OH \cdot v dýchacím řetězci mitochondrií ve vazbě s enzymem cytochromoxidázou, tak není škodlivý. Volný je však nejreaktivnějším radikálem v živých organizmech a působí jako extrémně silné oxidační činidlo reagující s nenasycenými mastnými kyselinami, aminokyselinami a nukleovými kyselinami (Štípek et al., 2000).

Haberova-Weissova reakce: $O_2\cdot^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH\cdot + OH\cdot$

2.2.1.3 Peroxylový radikál

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, polyunsaturated fatty acid) podléhají enzymatické peroxidaci (působení lipooxygenáz a cyklooxygenáz) nebo neenzymatické peroxidaci (působení volných radikálů). Takto vzniklý peroxylový radikál (ROO \cdot) se účastní peroxidace lipidů, při níž je poškozována struktura buněčných membrán, a ty jsou pak propustnější. ROO \cdot se uplatňuje také v buněčné signalizaci a expresi genů (Štípek et al., 2000).

2.2.2 Neradikálové ROS

2.2.2.1 Peroxid vodíku

H₂O₂ vzniká dvouelektronovou redukcí molekulárního kyslíku nebo jednoelektronovou redukcí O₂ \cdot^- , kterou katalyzují SOD. Účastní se vzniku volných radikálů, jeho reakce s biomolekulami jsou ale pomalé. V přítomnosti dvojmocného železa nebo jednomocné mědi se H₂O₂ rychle redukuje na velmi reaktivní OH \cdot . Tato redukce pomocí přechodných kovů se nazývá Fentonova reakce. Z organismu je H₂O₂ odstraňován katalázou (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Fentonova reakce: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$

2.2.2.2 Singletový kyslík

Pokud molekulární kyslík získá během chemických reakcí energii, využije ji ke změně elektronové konfigurace nepárových elektronů, čímž vznikne singletový kyslík (¹O₂). V organizmech vzniká ¹O₂ pohlcením světla některými pigmenty nebo při spontánní neenzymatické dismutaci O₂ \cdot^- . ¹O₂ je velice reaktivní, reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami za vzniku lipidových peroxidů (Štípek et al., 2000).

2.3 Reaktivní formy dusíku

Syntáza oxidu dusnatého (NOS) katalyzuje přeměnu L-argininu na oxid dusnatý (NO) a L-citrulin. NO je hydrofobní molekula, která prochází membránami a funguje jako druhý posel signálních drah v kardiovaskulárním systému (Alderton et al., 2001). NO je v organismu produkován v dostatečné koncentraci, takže může kompetovat o $O_2^{\cdot -}$ se SOD a podílet se tak na vzniku reaktivnějšího peroxynitritu (ONOO⁻). Ten je nebezpečný kvůli své schopnosti nitrace a hydroxylace tyrozinu, nitrace a deaminace bází deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a peroxidace lipidů (Rubbo et al., 1994).

2.4 Produkce ROS a RNS

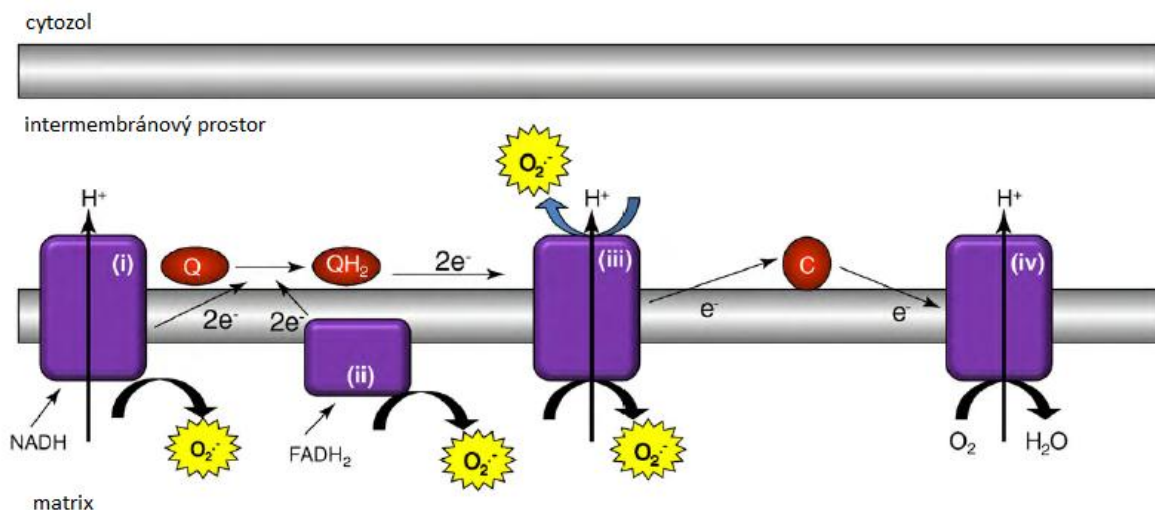
V organismu jsou ROS a RNS produkovány endogenními a exogenními zdroji. Endogenní zdroje jsou mitochondriální dýchací řetězec, NADPH (nikotinamidadeninindinukleotidfosfát) oxidáza, xantin oxidáza, cyklooxygenáza a NOS. Exogenní zdroje zahrnují vnější fyzikální podmínky, konkrétně ionizující nebo ultrafialové záření.

2.4.1 Mitochondrie

Nejvýznamnějším producentem ROS je elektron-transportní řetězec v mitochondriích, konkrétně komplexy I, II a III (Hamanaka and Chandel, 2010). V myocytech dochází k tvorbě $O_2^{\cdot -}$ na komplexech I a III. Některé zdroje uvádějí, že až 5 % kyslíku v elektron-transportním řetězci je přeměněno na $O_2^{\cdot -}$. Primárně zde dochází k tvorbě $O_2^{\cdot -}$, sekundárně k tvorbě H_2O_2 působením SOD.

Komplex I (NADH dehydrogenáza, EC 1.6.5.3) přenáší elektrony z NADH (nikotinamidadeninindinukleotid) na redukovaný koenzym Q (ubichinol). Během toho může dojít k přenesení elektronu na molekulární kyslík a tvorbě $O_2^{\cdot -}$. Komplex I generuje $O_2^{\cdot -}$ vždy do mitochondriální matrix.

Komplex III (cytochrom bc1 komplex, EC 1.10.2.2) působí jako ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza. Oxiduje ubichinol na ubichinon, a zároveň redukuje cytochrom c. Při oxidaci ubichinolu může docházet ke vzniku $O_2^{\cdot -}$, který je generován do mitochondriální matrix nebo do intermembránového prostoru mitochondrií.



Obr. 1 Mitochondriální elektron-transportní řetězec produkuje ROS, upraveno podle (Hamanaka and Chandel, 2010). Mitochondriální komplexy I a II využívají elektrony z NADH a FADH₂ k redukci koenzymu Q. Koenzym Q předává tyto elektrony na komplex III, odkud jsou přeneseny na cytochrom c. Komplex IV využívá tyto elektrony k redukci molekulárního kyslíku na vodu. Aktivita komplexů I, III a IV produkuje elektron-chemický protonový gradient, z něhož je volná energie využita k fosforylaci ADP pomocí ATP syntázy. Komplexy I, II a III produkují O₂⁻ během neúplné redukce kyslíku. Zatímco komplexy I a II uvolňují O₂⁻ pouze do mitochondriální matrix, z komplexu III přechází O₂⁻ jak do mitochondriální matrix, tak do intermembránového prostoru mitochondrií. Použité zkratky: NADH, redukovaný nikotinamidadenindinukleotid; FADH₂, redukovaný flavinadenindinukleotid; O₂⁻, superoxidový aniont; Q/QH₂, ubichinol/ubichinon (redukovaný/oxidovaný koenzym Q); C, cytochrom c.

ROS vznikající v elektron-transportním řetězci jsou velmi rychle odstraňovány, závažným problémem mohou být pouze v patologických stavech, když jich vzniká nadbytek (Gomes et al., 2012).

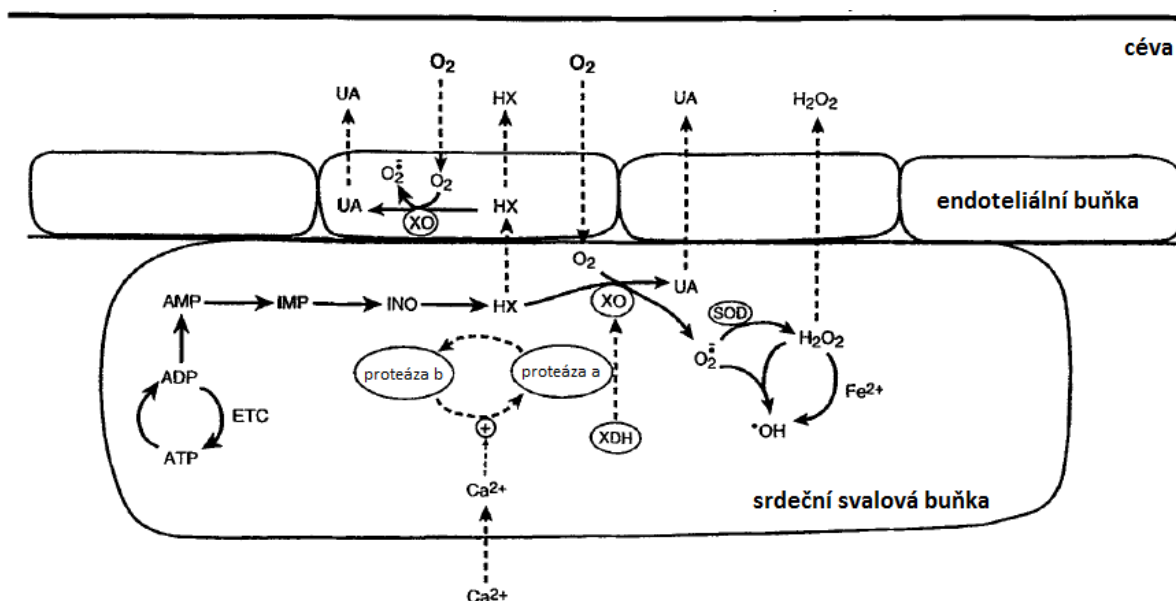
2.4.2 NADPH oxidáza

NADPH oxidáza (EC 1.6.3.1) je hlavní zbraní imunitního systému. Pokud makrofágy nebo neutrofilové rozpoznají cizorodou částici v organismu, fagocytují ji a dochází k fosforylaci zatím neaktivní NADPH oxidázy. Ta je po fosforylaci aktivována připojením několika podjednotek z cytozolu a uvnitř fagocytující buňky katalyzuje přenos elektronů z NADPH na molekulární kyslík, který se takto mění na O₂⁻. Tento proces se nazývá respirační vzplanutí. NADPH oxidáza má však různé homology působící v dalších místech, kde zvyšování oxidační nerovnováhy ve prospěch ROS může způsobovat poškození organismu (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2.4.3 Xantinoxidáza

Xantinoxidáza (XO, EC 1.17.3.2) patří do rodiny enzymů xantinoxidoreduktáz (XOR), které katalyzují přeměnu hypoxantinu na xantin. Do této rodiny patří také enzym xantindehydrogenáza (XDH, EC 1.17.1.4). Eukaryotní XOR obsahují dvě železo-sírná centra, molybdenové centrum a FAD (oxidovaný flavinadenindinukleotid). XDH přenáší elektrony na NAD^+ (oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid). Za patologických podmínek dochází ke konvertování XDH na XO, která přenáší elektrony na molekulární kyslík, čímž produkuje O_2^- a H_2O_2 (obr. 2).

XO se nachází uvnitř endotelových buněk nebo je navázána na jejich povrchu. Při srdečních chorobách, například při ischemii, je její exprese zvýšená (Ji and Leichtweis, 1997).



Obr. 2 Role xantin oxidázy v tvorbě volných radikálů ve svalové a endoteliální buňce, upraveno podle (Ji and Leichtweis, 1997). Použité zkratky: AMP (ADP, ATP), adenosinmono-(di-, tri-) fosfát; ETC, elektron-transportní řetězec; H_2O_2 , peroxid vodíku; HX, hypoxantin; IMP, inozinmonofosfát; INO, inozin; O_2^- , superoxidový aniont; OH^\bullet , hydroxylový radikál; SOD, superoxididizmutáza; UA, kyselina močová; XDH, xantin dehydrogenáza; XO, xantin oxidáza.

2.4.4 Cytochrom P450

Cytochrom P450 monooxygenázy (EC 1.14.14.1) jsou membránově vázané hemoproteiny, které se nacházejí v membráně endoplazmatického retikula. Účastní se metabolismu steroidů, žlučových kyselin, mastných kyselin a xenobiotik. Molekula cytochromu P450 obsahuje atom železa, který má za úkol oxidovat substrát. Během oxidace dochází k přenosu elektronů mezi atomem železa a molekulou kyslíku, přičemž může docházet k tvorbě O_2^- (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2.4.5 Syntéza oxidu dusnatého

NOS (EC 1.14.13.39) oxiduje L-arginin za vzniku L-citrulinu a NO[•]. Jsou známy tři izoformy NOS: neuronální (nNOS, NOS I), endotelová (eNOS, NOS III) a indukibilní (iNOS, NOS II), přičemž nNOS a eNOS jsou označovány jako konstitutivní izoformy (cNOS), protože jsou regulovány druhými posly, zatímco iNOS je regulována cytokiny a bakteriálními produkty (Alderton et al., 2001).

cNOS jsou exprimovány ve zdravém organismu. Za přítomnosti Ca²⁺ mohou několik minut syntetizovat NO[•] jako odpověď na chemickou nebo mechanickou stimulaci. Naopak iNOS se uplatňuje v patologických procesech. Ke své aktivitě nepotřebují Ca²⁺ a mohou působit po dobu několika dní.

eNOS mohou sloužit také jako zdroj O₂^{•-}. Za zvýšené koncentrace ONOO⁻ dochází k rozpadu heterodimeru eNOS na monodimery, které nejsou schopny vázat kofaktory nutné pro syntézu NO[•], a tak dochází k přenosu elektronů na kyslík a ke vzniku O₂^{•-} (Vásquez-Vivar et al., 1998).

2.5 Antioxidační ochranný systém

ROS a RNS rychle reagují s důležitými biomolekulami (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny). Za určitých okolností se však jejich rychlá reaktivita s okolními biomolekulami stává velice nebezpečnou, ROS a RNS mohou působit jako toxické látky. Organismus se před těmito toxickými látkami může chránit třemi způsoby: zabrání jejich tvorbě, odstraní již vytvořené ROS a RNS, použije reparační mechanismy na opravení poškozených biomolekul.

Prvním způsobem je ochrana před vznikem nadměrného množství ROS a RNS. Ta spočívá v regulaci aktivity enzymů, které katalyzují jejich vznik (např. NOS), nebo proteinů vylučujících tranzitní kovy z reaktivních pozic (např. transferin, feritin). Druhým způsobem ochrany je odstraňování již vytvořených radikálů. Antioxidanty přeměňují reaktivní molekuly na méně reaktivní. Tyto přeměny se dělí na enzymatické (SOD, glutathionperoxidázy, kataláza apod.) nebo neenzymatické (redukovaný glutathion, vitamíny C a E apod.). Třetí možností jsou reparační mechanismy poškozených biomolekul. Ty jsou rozpoznány a proteolyticky rozštěpeny nebo jsou opraveny reparačními enzymy.

2.5.1 Enzymatické antioxidanty

2.5.1.1 Superoxidodismutázy

Superoxidodismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) je obsažena v každé buňce. Katalyzuje reakci, při níž se jedna molekula O₂^{•-} oxiduje a druhá redukuje. Tato reakce se nazývá dismutace a vede ke vzniku kyslíku a H₂O₂. SOD odstraňuje z buněk a extracelulárního prostoru přebytečné O₂^{•-}. Existují tři různé izoformy SOD, které se od sebe liší místem působení a strukturou. Jsou to cytosolická měď-zinková (Cu,ZnSOD, SOD1), mitochondriální manganová (MnSOD, SOD2) a extracelulární SOD (ecSOD, SOD3).

dizmutace: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (McCord and Fridovich, 1969)

Cu,ZnSOD se skládá ze dvou identických podjednotek, každá obsahuje jeden atom mědi a jeden atom zinku. Katalyzuje reakce v cytozolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Cu^{2+} se redukuje na Cu^{1+} , a poté se oxiduje do původního stavu. Při této reakci dochází k přenosu elektronů z jedné molekuly $O_2^{\cdot -}$ na druhou. Zn^{2+} se neúčastní samotné katalýzy, ale má stabilizační funkci.

MnSOD působí v mitochondriální matrix jako tetramer. Je syntetizována v podobě proenzymu v cytozolu. Do mitochondrií se dostává pomocí mitochondriálního lokalizačního signálu. MnSOD je méně stabilní než Cu,ZnSOD. Podle mnoha studií existuje korelace mezi zvyšující se syntézou MnSOD a ochranou srdce před infarktem myokardu (Chen et al., 1998).

ecSOD, podobně jako cytozolická Cu,ZnSOD, obsahuje ionty mědi a zinku. Iont mědi katalyzuje dizmutaci a iont zinku stabilizuje molekulu enzymu. ecSOD se skládá ze čtyř podjednotek. Je syntetizována v cytozolu, ale obsahuje signální sekvenci pro sekreci do extracelulární matrix, kde také působí (Štípek et al., 2000).

2.5.1.2 Peroxiredoxiny

Peroxiredoxiny (Prxs, EC 1.11.1.15) obsahují dva cysteiny a jsou důležité pro katalýzu štěpení H_2O_2 v srdci. Odebráním kyslíku redukují H_2O_2 na vodu a samy se dočasně oxidují za vzniku intermolekulárního disulfidického můstku. Prxs jsou regenerovány pomocí enzymu tioredoxinu (Trx), který redukuje disulfidický můstek Prx. Trx je zpětně redukován tioredoxinreduktázou za přítomnosti NADH (Park et al., 2012).

2.5.1.3 Glutathionperoxidázy

Glutathionperoxidázy (GPx) odstraňují intracelulární hydroperoxydy. Patří mezi selenoproteiny. Součástí aktivního centra enzymu je selenocystein, který dvěma elektrony redukuje H_2O_2 na hydroxylovou skupinu nebo vodu, zatímco se sám oxiduje na selenol. Selenol se regeneruje zpět na selenocystein pomocí dvou elektronů ze dvou redukovaných glutationů (GSH).

Cytozolická GSH-glutathionperoxidáza (cGPx, EC 1.11.1.9) funguje jako tetramer. cGPx rozkládá hydroperoxydy mastných kyselin, které byly nejdříve uvolněny z poškozených lipidů pomocí fosfolipázy A_2 . Ve spolupráci s enzymem katalázou se také podílí na odstraňování H_2O_2 z buněk.

Fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza (PHGPx, EC 1.11.1.12) je funkční monomer. PHGPx redukuje fosfolipidové hydroperoxydy. Dochází k tomu přímo v membránách, PHGPx nevyžaduje předchozí uvolnění mastných kyselin z poškozených lipidů. Zabraňuje také neenzymatické peroxidaci lipidů. α -tokoferol redukuje v membránách ROO^{\cdot} na hydroperoxydy, které jsou dále redukovány prostřednictvím PHGPx za současné oxidace GSH. Takto PHGPx zabraňuje rozkladu hydroperoxidů na alkoxylové radikály a vzniku dalších radikálových řetězových reakcí v membráně (Štípek et al., 2000).

2.5.1.4 Glutationtransferázy

Tyto enzymy působí v cytozolu a katalyzují konjugační reakce. Glutationtransferázy (GST, EC 2.5.1.18) vážou sulfhydrylovou skupinu GSH na elektrofilní organickou látku, čímž tuto látku detoxikují. GST mají velký význam při odstraňování produktů peroxidace. Konjugační reakcí 4-hydroxynonenalu (produkt peroxidace lipidů) s GSH dochází k jeho inaktivaci a vyloučení z organismu (Ishikawa et al., 1986).

2.5.1.5 Kataláza

Kataláza (EC 1.11.1.6) je enzym skládající se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka obsahuje Fe^{3+} . Kataláza katalyzuje dvouelektronovou dismutaci H_2O_2 na kyslík a vodu. Tato reakce má velký význam v inaktivaci H_2O_2 v peroxizomech. Kataláza je schopná reagovat také s alkylperoxyd, její reaktivita je však nízká. V antioxidační ochraně se v reakcích s alkylperoxyd uplatňují glutationperoxydázy (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2.5.2 Neenzymatické antioxidyanty

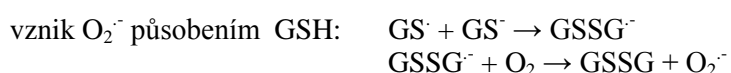
Neenzymatické antioxidyanty můžeme rozdělit podle jejich molekulární hmotnosti na vysokomolekulární (proteiny) a nízkomolekulární. Vysokomolekulární antioxidyanty jsou významné především svojí schopností uchovávat přechodné prvky v oxidované formě, aby nemohly vstupovat do reakcí vytvářejících ROS a RNS. Dále mohou opravovat některá poškození. Nízkomolekulární antioxidyanty se účastní reakcí s ROS a RNS, čímž je neenzymaticky přeměňují na méně reaktivní látky. Často také pomáhají enzymovým antioxidyantům. Důležitými zástupci nízkomolekulárních antioxidyantů jsou glutation, vitamín C a vitamín E.

2.5.2.1 Vysokomolekulární antioxidyanty

Ceruloplazmin váže a skladuje měď. Navíc má feroxydázovou aktivitu, oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} , a tím umožňuje uvolňování železa z buněk a jeho uskladnění v transferinu. Přenašečový protein transferin pevně váže Fe^{3+} , a zabraňuje mu tak ve vstupu do Fentonovy reakce. Feritin má také feroxydázovou aktivitu, která zajišťuje jeho antioxidační účinky. Mezi antioxidyanty, které se uplatňují při opravách poškozených konformací proteinů, jsou zařazovány chaperony. Ty poškozené proteiny rozeznávají, vážou se na ně, a urychlují tak jejich odstraňování v proteazomech (Štípek et al., 2000).

2.5.2.2 Nízkomolekulární antioxidanty

Glutation, chemicky γ -glutamylcysteinylglycin, se v buňkách vyskytuje častěji ve formě GSH. Snadno se oxiduje a s další molekulou glutationu tvoří disulfid (GSSG, oxidovaný glutation). GSH se na odstraňování ROS podílí více způsoby. Neenzymaticky reaguje s různými ROS za vzniku glutatoylového radikálu ($GS\cdot$), který je méně reaktivní než původní ROS. Problém může nastat, pokud $GS\cdot$ reaguje s GSH (ten musí být v disociovaném stavu - GS^-). Takto vzniká radikál oxidovaného glutationu ($GSSG\cdot^-$), který působí jako velmi silné redukční činidlo a je schopen redukce stabilního kyslíku na nestabilní $O_2\cdot^-$.



GSH je také nezbytným substrátem GPx a GST. Udržuje sulfhydrylové skupiny v redukované formě, regeneruje α -tokoferol a askorbát. Důležitým znakem oxidačního stresu je pokles koncentrace GSH v buňkách. K regeneraci GSH z GSSG dochází za katalýzy enzymu glutationreduktázy (Aguiló et al., 2005).

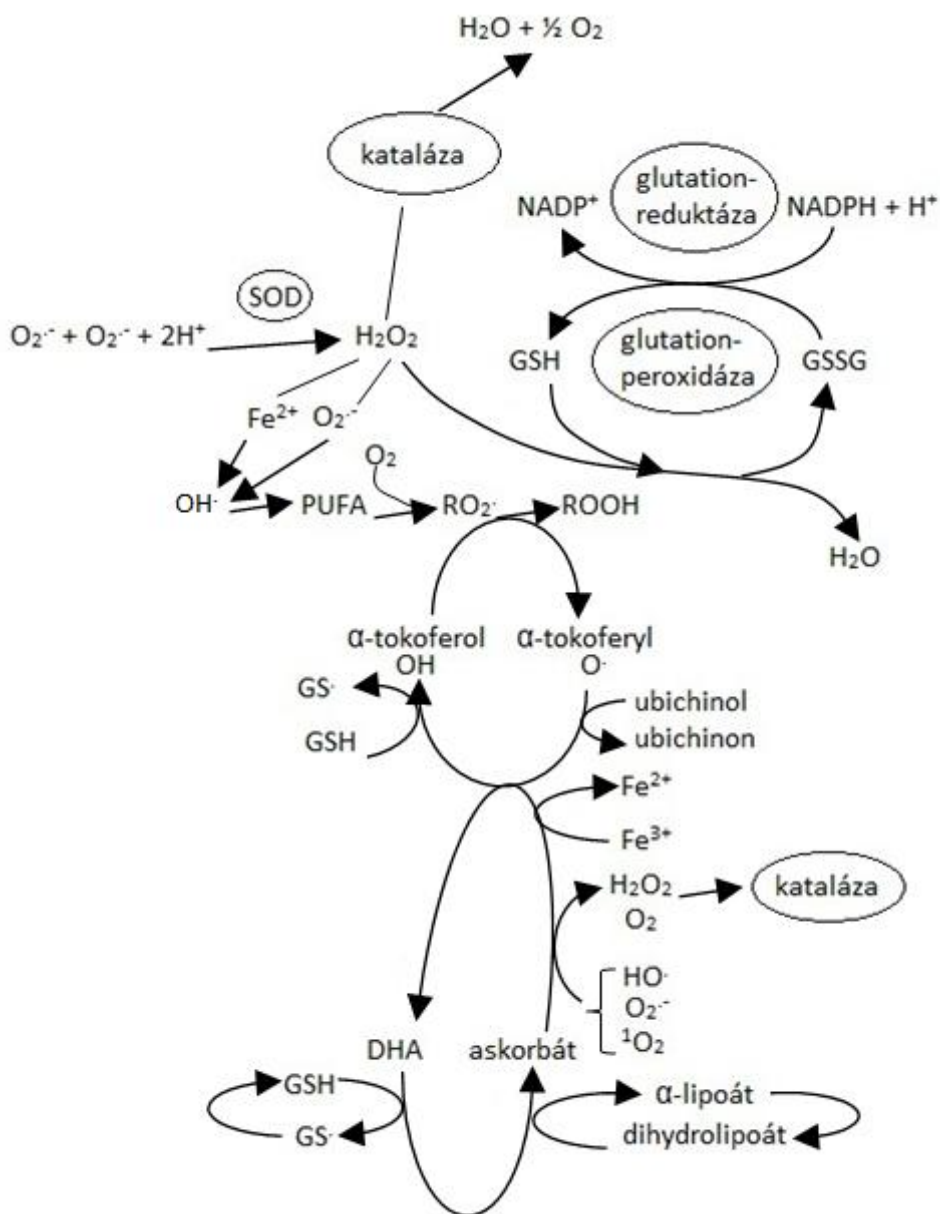
Askorbát neboli vitamín C je důležitým redukčním činidlem. Jeho hlavní úloha spočívá v redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} a Cu^{2+} na Cu^{1+} . Ztrátou elektronu se askorbát mění na semidehydroaskorbát neboli askorbátový radikál. Tento radikál je mnohem méně reaktivní než ostatní zde jmenované radikály. K jeho regeneraci na askorbát dochází speciální dehydrogenázou za účasti NADH. Také může samovolně dizmutovat na askorbát a dehydroaskorbát, který je pomocí dehydroaskorbátoreduktázy a GSH opět regenerován na askorbát.

α -tokoferol je součástí vitamínu E. Má lipofilní charakter, proto je antioxidační látkou membrán. Přeměňuje peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než dojde k dalším radikálovým reakcím a k peroxidaci sousedních lipidů. Alkylperoxylové radikály přeměňuje na hydroperoxydy, které následně odstraňují GPx. Sám se zároveň mění na velice stabilní tokoferylový radikál.

Mnoho dalších látek je označováno jako antioxidanty právě proto, že pomáhají α -tokoferolu v antioxidační ochraně a účastní se regenerace tokoferylového radikálu. Patří sem například askorbát, ubichinon, karotenoidy, kyselina lipoová, bilirubin (Štípek et al., 2000).

2.5.3 Vztahy mezi antioxidanty

Důležitou součástí antioxidační ochrany je dostatečná antioxidační kapacita a vyvážené působení jednotlivých antioxidantů (viz obr. 3). Enzym SOD může být pro organismus škodlivý, pokud vznikající H_2O_2 nebude dostatečně odstraňován pomocí GPx nebo katalázy. GPx však vyžaduje ke svému působení dostatečné množství GSH. α -tokoferol zase může tlumit lipidovou peroxidaci jen tehdy, bude-li dostatečně regenerován askorbátem a GSH. Nadměrné množství askorbátu však může způsobit, že se z feritinu uvolní železo, které katalýzou Fentonovy reakce přispívá k tvorbě $O_2\cdot^-$. Proto je velmi důležitá vyváženost působení celého antioxidačního systému (Štípek et al., 2000).



Obr. 3 Vztahy mezi antioxidanty, upraveno podle (Štípek et al., 2000).
 Použité zkratky: 1O_2 , singletový kyslík; DHA, dehydroaskorbát; GS $^\cdot$, glutathionový radikál; GSH/GSSG, redukovaný/oxidovaný glutation; H_2O_2 , peroxid vodíku; $NADP^+/NADPH$, oxidovaný/redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát; O_2^\cdot , superoxidový aniont; OH^\cdot , hydroxylový radikál; PUFA, polynenasycené mastné kyseliny; RO_2^\cdot , alkylperoxylový radikál; ROOH, alkylperoxid; SOD, superoxididizmutáza.

3 Úloha oxidačního stresu při cvičení

Je dobře prozkoumáno, že cvičením vzniká velké množství ROS. Ty jsou označovány za škodlivé, protože způsobují oxidační stres. Chronický nárůst koncentrace ROS během degenerativních chorob může být škodlivý (Halliwell and Gutteridge, 2007). Někteří vědci se domnívají, že akutní produkce ROS během tělesného cvičení může být výhodná a přispívá k některým adaptacím objevujícím se po cvičení (Scheele et al., 2009). Jiní se s tímto názorem neshodují a tvrdí, že ROS mají inhibiční efekt na zotavování svalů a doporučují antioxidační léčbu svalové únavy (Andrade et al., 1998). Další argumentují tím, že nízké hladiny ROS jsou požadovány ve svalovém metabolismu, zatímco vyšší hladiny ROS podporují kontraktilní dysfunkci vyúsťující ve svalovou slabost a únavu (Powers and Jackson, 2008). Tyto předpoklady jsou podpořeny následujícími pozorováními: ROS jsou považovány za endogenní mediátory svalové únavy během cvičení, protože inhibují citlivost k vápníku (Andrade et al., 1998), ROS mohou být příčinou poškození DNA, lipidové peroxidace a proteinové karboxylace (Rubbo et al., 1994). Existují také pozorování o opačné schopnosti ROS - schopnosti účastnit se signálních drah vedoucích ke kardioprotekci (Lee and Wei, 2005).

3.1 Mechanismus endogenní kardioprotekce

V srdci existují endogenní protektivní dráhy, které jsou indukovány různými stresovými podmínkami. Kardioprotektivní účinky byly prokázány po preconditioningu (Murry et al., 1986), postconditioningu (Zhao et al., 2003), adaptaci na chronickou hypoxii (Kolář and Ošťádal, 2004), podání různých farmak (Dickson et al., 2007) a tělesném cvičení (Powers et al., 2002). Mechanismus endogenní kardioprotekce není ještě úplně znám, ale významnou roli v něm hraje kolaterální krevní oběh (Laughlin et al., 1998), zvýšení koncentrace proteinů tepelného stresu (Mehta et al., 1988), zvýšení aktivity cyklooxygenázy-2 (Bollí et al., 2002), zvýšení koncentrace stresových proteinů endoplazmatického retikula (Okada, 2004), aktivace sarkolemálních a mitochondriálních draslíkových kanálů závislých na ATP (Brown, 2005; Costa, 2005) a zvýšení antioxidační kapacity (Adlam et al., 2005). Velký význam je však připisován i ROS a RNS (de Waard et al., 2009; Erickson et al., 2008).

3.2 Možnosti jak vyvolat endogenní kardioprotekci

Možností, jak vyvolat endogenní kardioprotekci, je hned několik. Důležité je však prozkoumat, která z nich je nejefektivnější, tzn. lze ji snadno a včas aplikovat, a zároveň má významné kardioprotektivní účinky. Následuje krátké shrnutí nejdůležitějších stimulů srdeční ochrany.

Murry et al. popsali v roce 1986 kardioprotektivní účinky ischemického preconditioningu (IPC). Metoda IPC spočívá v opakování krátkých fází ischemie, navozených například podvazem koronárních arterií, před dlouhodobější ischemickou příhodou. IPC takto navozuje ischemickou toleranci v srdci, snižuje rozsah infarktu myokardu, zmírňují následky reperfúze a předchází poškození endoteliálních buněk (Murry et al., 1986). Následná kardioprotekce má dvě fáze, akutní a opožděnou. Akutní fáze se projeví okamžitě a trvá několik hodin, zatímco opožděná fáze začíná působit až několik hodin po IPC a může trvat i několik dní (Kuzuya et al., 1993; Marber et al., 1993).

Postconditioning spočívá v aplikaci krátkých přerušovaných cyklů ischemie po dlouhodobější ischemické příhodě. Provádí se v časně fázi reperfúze a bylo dokázáno, že jeho kardioprotektivní účinky jsou srovnatelné s účinky IPC (Zhao et al., 2003).

Chronická hypoxie je dlouhodobé snížení přísunu kyslíku do tkání v důsledku sníženého parciálního tlaku kyslíku v arteriích. Z dlouhodobého hlediska je takový stav nepřijatelný, proto se organismus adaptuje, což vede ke snížení výskytu a závažnosti komorových arytmií, snížení rozsahu infarktu myokardu a zlepšení obnovy postischemických kontraktilních funkcí srdce. U chronické hypoxie dále rozlišujeme systémovou hypoxii (adaptace na vysokou nadmořskou výšku), histotoxickou hypoxii (podávání nízkých dávek CoCl_2 , které vede k záměně kobaltu za železo v hemoglobinu), anemickou hypoxii (snížení počtu erytrocytů, které jsou schopné přenášet kyslík) a ischemickou hypoxii (v části krevního řečiště je omezen průtok krve) (Ošťádal and Kolář, 2007).

Neméně významné je podávání farmak, která v buňce navozují stresové podmínky. Opioidy, adenosin a cytokiny se vážou na příslušné receptory na plazmatické membráně, a spouštějí signální dráhy vedoucí ke kardioprotekci. Důležité jsou také resveratrol a katechiny s antioxidačními účinky obsažené např. v červeném víně (Hung et al., 2000). Dále omega-3 mastné kyseliny, které snižují riziko vzniku srdečních arytmií (Billman et al., 1994).

Tělesné cvičení je další možností, jak indukovat kardioprotekci. Je prokazatelné, že pravidelné cvičení zlepšuje srdeční toleranci k I/R poškození bez ohledu na věk či pohlaví. Konkrétně, cvičení chrání kardiomyocyty před oxidačním stresem vyvolaným I/R, a také chrání mitochondrie, které jsou hlavním producentem ROS při cvičení. Srdce je tak chráněno před I/R arytmiemi a buněčnou smrtí. Je známo, že v mechanismu kardioprotekce vyvolané tělesným cvičením jsou důležité sarkolemální na ATP závislé draselné kanály, antioxidační enzymy a neenzymové antioxidy. V poslední době je velký význam připisován také ROS a RNS.

3.3 Kardioprotektivní účinky tělesného cvičení - úloha ROS

Kardioprotektivní účinky tělesného cvičení jsou všeobecně známy, ale mechanismy vedoucí k ochraně srdce během cvičení jsou zatím předmětem výzkumu. Přestože se při cvičení tvoří velké množství ROS a RNS, což může vést k oxidačnímu stresu, je právě jim připisována důležitá úloha v ochraně srdce. Některé studie potvrzují, že zvýšená tvorba ROS během cvičení indukuje pozitivní adaptaci organismu, například vede ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů, zvýšení množství neenzymových antioxidantů, stimuluje angiogenezi, biogenezi mitochondrií a nárůst svalové hmoty.

3.3.1 Zvýšená aktivita antioxidantních enzymů a množství neenzymových antioxidantů

Nejzávažnějším onemocněním srdce je ischemická choroba srdeční, která je nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Přestože se na I/R poškození podílí mnoho faktorů, podstatnou roli zde hraje zvýšená produkce ROS. Proto je velice důležitá funkční antioxidantní ochrana, která eliminuje vznikající ROS a RNS, a snižuje tak vznikající oxidační stres v kardiomyocytech. Antioxidanty však nikdy zcela neodstraňují ROS a RNS, ale ponechávají je v těle v nízkých fyziologických koncentracích. Ty nepoškozují organismus, ale účastní se buněčné signalizace. Signální dráhy zahrnující ROS a RNS často vedou k buněčné proliferaci, diferenciaci či apoptóze a jsou také významné při regulaci různých transkripčních faktorů.

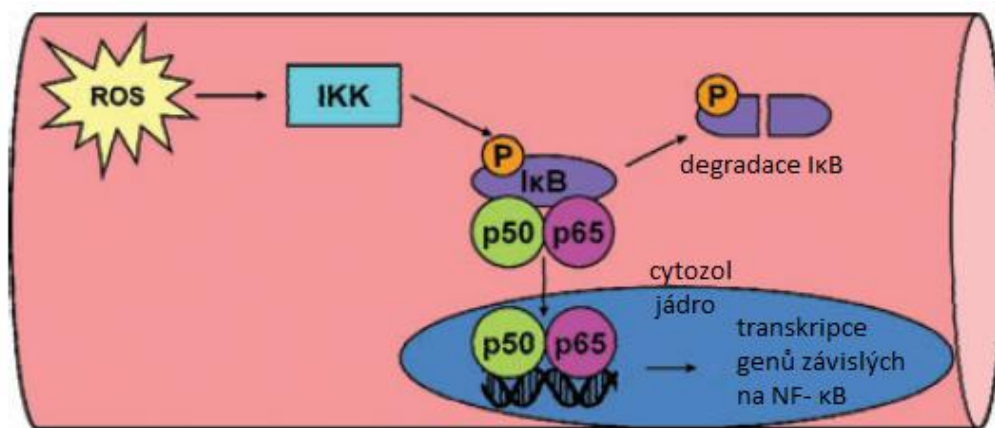
Demirel et al. ve své studii na potkanech sledovali vliv 3-5 denního cvičení na zvýšení aktivity a koncentrace osmi důležitých srdečních antioxidantů - MnSOD, Cu,ZnSOD, GPx, katalázy, glutathionreduktázy, tioredoxinreduktázy a GSH. Tyto antioxidanty byly vybrány kvůli své odlišné úloze v antioxidantním ochranném systému. Po cvičení bylo pozorováno zvýšení aktivity MnSOD a zvýšení koncentrace GSH, z čehož vyplývá, že právě tyto dvě důležité antioxidantní složky mohou srdci poskytnout ochranu před I/R poškozením. MnSOD a GPx pracují jako jeden celek v odstraňování ROS. Po vytvoření $O_2^{\cdot -}$ v mitochondriích okamžitě dochází k jeho dizmutaci na H_2O_2 . Tuto reakci katalyzuje MnSOD. Vzniklý H_2O_2 je poté odstraňován GPx za využití GSH jako substrátu. Přestože cvičení nezvyšuje aktivitu srdeční GPx, celkové schopnosti odstranit H_2O_2 může být dosaženo zvýšením buněčné koncentrace GSH. Je pravděpodobné, že zvýšená aktivita MnSOD a zvýšená koncentrace GSH, jsou zapotřebí k srdeční antioxidantní ochraně před I/R poškozením. Tudíž je možné, že cvičením vyvolané zlepšení srdeční antioxidantní ochrany může alespoň částečně vysvětlit zlepšenou obnovu srdeční kontraktility po I/R ataku (Demirel et al., 2001).

Další podobná studie na potkanech také prokázala zvýšení aktivity MnSOD po cvičení. Aktivita ostatních SOD se nezvýšila. Tyto výsledky potvrzují teorii, že hlavní tvorba ROS během cvičení probíhá v mitochondriích. Přestože se aktivita MnSOD zvýšila, nedošlo ke zvýšení srdeční mRNA pro MnSOD. Po vystavení ischemii trvající 30 minut a následné reperfúzi trvající 90 minut,

srdce trénovaných potkanů vykazovalo menší velikost infarktu ve srovnání s kontrolními potkany (Marini et al., 2007). Vyvoláním hypoxie a následné reoxygenace na kulturách potkaních myocytů bylo dokázáno, že *de novo* syntéza MnSOD přímo zvyšuje toleranci srdce k dlouhodobější hypoxii (Yamashita et al., 1994).

Bylo potvrzeno, že kardioprotekce se může uplatnit ve dvou časových oknech, přičemž první okno je aktivní minuty až hodiny po stresu, zatímco druhé okno protekce (SWOP, second window of protection), je aktivní 1-3 dny poté. Předpokládá se, že trénink prováděný pravidelným tělesným cvičením, které má dlouhotrvající účinek, vede ke kardioprotekci specifické pro SWOP (Marini et al., 2007).

Vědci pozorovali, že akutní cvičení aktivuje expresi MnSOD v kosterních svalech potkana prostřednictvím aktivace jaderného transkripčního faktoru kappa B (NF- κ B, viz obr. 4) (Hollander et al., 2001). NF- κ B se v cytoplazmě nachází jako komplex Rel-proteinů, konkrétně p65 a p50, k němuž je připojen jeho inhibitor (I κ B). NF- κ B může být aktivován různými stimuly, jedním z nich je H₂O₂, který aktivuje I κ B kinázu (IKK). IKK fosforyluje I κ B, ten se odpojí od NF- κ B a následně je ubiquitinován a proteolyticky rozštěpen. Oddělením I κ B dochází k aktivaci NF- κ B a jeho přenosu do jádra, kde se váže na příslušný úsek DNA a aktivuje transkripci genů vedoucích k syntéze MnSOD. ROS jsou tedy přímo zahrnuty v signálních drahách vedoucích ke zvýšení exprese antioxidantních genů prostřednictvím aktivace NF- κ B v odpovědi na akutní cvičení (Ji, 2004).



Obr. 4 Kroky vedoucí k aktivaci NF- κ B a signalizace v buňce, upraveno podle (Powers et al., 2011). V nestresovaných buňkách je jaderný transkripční faktor NF- κ B vázán na inhibitor I κ B v cytozolu. Během oxidačního stresu se zvyšuje koncentrace ROS v cytozolu a dochází k aktivaci I κ B kinázy (IKK), která fosforyluje I κ B. Tato fosforylace iniciuje ubiquitinaci a následnou degradaci v proteazomu. Degradace I κ B odstraňuje inhibici a uvolňuje NF- κ B, takže se může translokovat do jádra a spustit transkripci příslušných genů. Použité zkratky: I κ B, inhibitor NF- κ B; IKK, I κ B kináza; P, fosfát; p50/p65, jaderný transkripční faktor κ B (NF- κ B); ROS, reaktivní formy kyslíku.

Netréované osoby vystavené vyčerpávajícímu cvičebnímu tréninku vykazovaly vyšší oxidační poškození než osoby, které cvičí pravidelně. To je převážně způsobeno zvýšenou regulací endogenních antioxidačních enzymů po pravidelném cvičení (Miyazaki et al., 2001).

Některé studie ukazují, že je po vyčerpávajícím tréninku koncentrace GSSG v krvi značně zvýšená. Oxidace GSH na GSSG je citlivý indikátor oxidačního stresu, což podporuje hypotézu, že se při cvičení zvyšuje oxidační stres (Sen, 1999). Zvýšená koncentrace GSSG v krvi po vyčerpávající jízdě na kole se objevila navzdory paralelnímu zvýšení aktivity glutationreduktázy v erytrocytech, která redukuje GSSG zpět na GSH (Aguiló et al., 2005). Téměř všechen krevní GSH reprezentuje jeho obsah v erytrocytech. Aktivita erytrocytární glutationreduktázy je dobrý parametr určující kapacitu pro redukci GSSG (Sen, 1999).

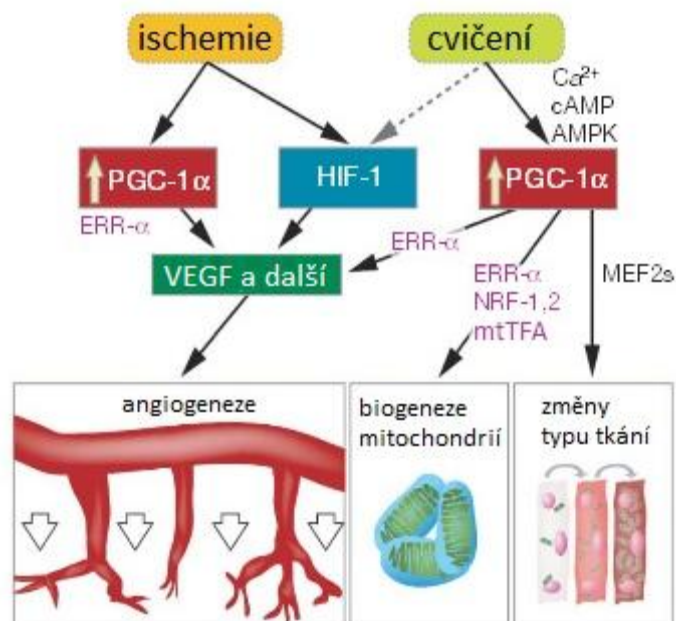
Přestože přesný mechanismus zodpovědný za kardioprotekci není znám, je pravděpodobné, že cvičením vyvolané změny v srdci jsou souhrnným výsledkem následných cvičebních tréninků po delší dobu (např. mnoho měsíců). Tento typ dlouhotrvajícího cvičebního tréninku prokazatelně zlepšuje srdeční antioxidační ochranu (Tauler et al., 1999).

3.3.2 Stimulace angiogeneze

Angiogeneze umožňuje růst nových cév z již existujících. V patologických procesech k ní dochází především při nedostatku kyslíku - hypoxii. Během hypoxie dochází k tvorbě proangienních faktorů, především vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). To bylo dokázáno ve studii na potkanech, ve které se vlivem hypoxie během tréninku zvýšila exprese VEGF v aktivní svalovině potkanů (Shweiki et al., 1992).

Při hypoxii se stabilizují transkripční faktory vyvolané hypoxií (HIF-1 α a HIF-2 α) a dochází k jejich transportu do jádra. V jádře interagují HIF-1 α a HIF-2 α s HIF- β a jako komplex se váží na specifickou sekvenci genu VEGF, což stimuluje jeho expresi. VEGF je poté sekretován do extracelulárního prostoru, kde působí především na endotelové buňky. Váže se na receptor pro VEGF (VEGFR2), který patří mezi tyrozinkinázové receptory - obsahuje vnitrobuněčnou doménu s tyrozinkinázovou aktivitou. Po navázání VEGF na VEGFR2 dochází k homodimerizaci receptorů, aktivaci jejich tyrozinkinázových domén a indukci autofosforylace. Následně se aktivují signální dráhy vedoucí k proliferaci, diferenciaci, migraci, přežití buněk a také propustnosti cév (Kallio et al., 1998).

Podle Gustafssona et al. se u lidí během cvičení zvyšuje exprese VEGF v důsledku translokace HIF-1 α a HIF-2 α do jádra. Po svalové aktivitě dochází také ke zvýšení exprese dalších proteinů důležitých pro angiogenezi, například VEGFR2. Je tedy pravděpodobné, že tělesné cvičení a hypoxie využívají stejný mechanismus při stimulaci angiogeneze (Gustafsson et al., 1999).



Obr. 5 Teoretický model role PGC-1 α v regulaci angiogeneze během cvičení a jako odpověď na ischemii, upraveno podle (Arany et al., 2008). Použité zkratky: AMPK, adenzinmonofosfátkináza; cAMP, cyklický adenzinmonofosfát; ERR- α , receptor α spojený s estrogenem; HIF-1, transkripční faktor-1 vyvolaný hypoxií; MEF2s, faktory-2 vylepšující myocyty; mtTFA, mitochondriální transkripční faktor A; NRF-1,2, jaderné respirační faktory-1,2; PGC-1 α , peroxizomální proliferací aktivovaný receptor gamma koaktivátor 1 α ; VEGF, vaskulární endoteliální růstový faktor.

Existují ale i další dráhy vedoucí k angiogenezi, v nichž se neuplatňuje HIF. Skupina vědců zkoumala roli koaktivátoru 1 α peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma (PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α) v regulaci angiogeneze během cvičení (obr. 5). S estrogenem spojený receptor α (ERR- α , estrogen-related receptor α) se jevil být důležitým v regulaci endogenního VEGF. Proto byla jeho funkce zkoumána na buňkách kosterního svalstva, které byly infikovány adenovirem kódujícím ERR- α . To vedlo k trojnásobné indukci VEGF mRNA, ve srovnání s kontrolními zvířaty. Důležité bylo zjištění, že ERR- α je potřebný pro indukci VEGF zprostředkovanou PGC-1 α . Myši zárodečné fibroblasty připravené z ERR- $\alpha^{-/-}$ a wild-type zvířat byly infikovány adenovirem kódujícím PGC-1 α . U wild-type myši došlo k sedminásobně vyšší expresi VEGF oproti kontrolám. Naopak u ERR- $\alpha^{-/-}$ byla exprese VEGF zcela potlačena. Podle těchto výsledků je pravděpodobné, že stimulace exprese VEGF zprostředkovaná PGC-1 α je alespoň z části

koaktivována ERR- α . Na základě těchto pozorování je možné spekulovat o PGC-1 α /ERR- α dráze, která zprostředkovává tvorbu cév (Arany et al., 2008).

Castierova studie zase poskytuje první důkaz, že ROS hrají zásadní roli v rozšiřování cév v důsledku chronicky zvýšeného průtoku krve při cvičení. Tato studie zkoumala vliv NADPH oxidázy a eNOS na myším modelu. Zjistilo se, že ONOO⁻ vznikající reakcí ROS a RNS, vytvářených právě těmito enzymy, se významně podílí na aktivaci metaloproteáz (MMPs). Kromě aktivace dochází zároveň ke zvýšení exprese MMPs v cévách, což následně vede k jejich rozšiřování. Produkce ROS je tedy zvýšená v cévách vystavených chronicky vysokému průtoku krve. ROS tak mají důležitou úlohu i v remodelaci cév (Castier, 2005).

3.3.3 Zvýšená biogeneze mitochondrií

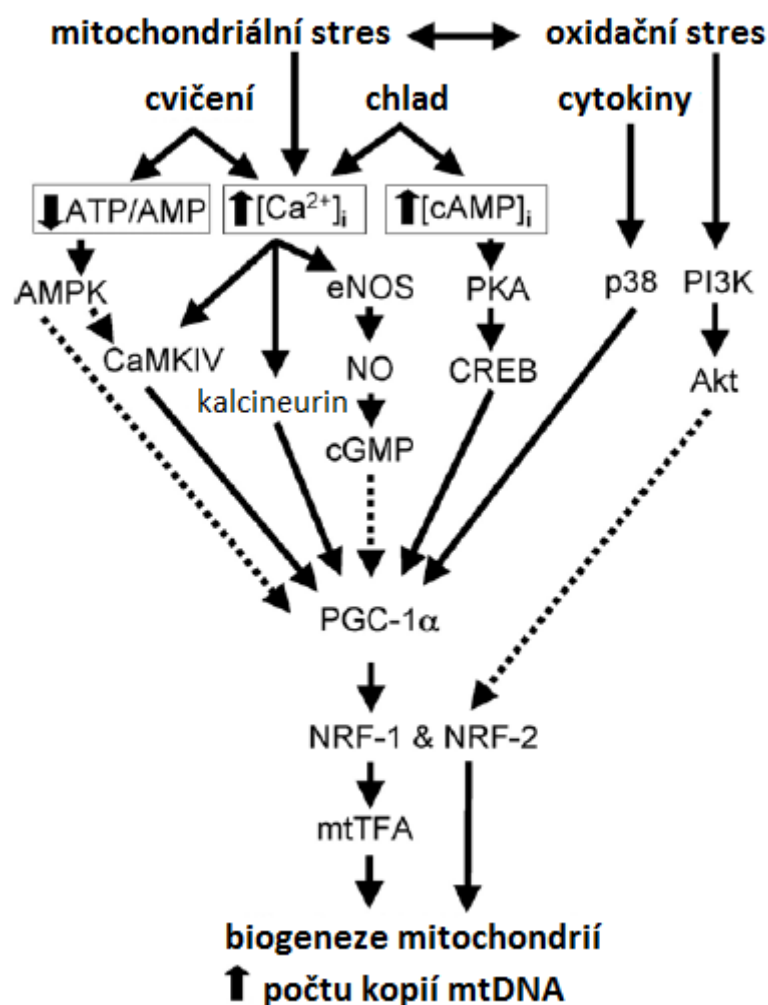
Je známo, že 1-5% O₂ je za fyziologických podmínek přeměněno v mitochondriích na ROS. Během aerobního cvičení dochází v mitochondriích ke zvýšené produkci ROS, tvořených jako vedlejší produkt aerobního metabolismu. Pokud je buňka vystavena stresovým podmínkám, například v důsledku oxidačního stresu vyvolaného cvičením, mitochondrie potřebují zvýšit energetický přísun pro opravy a likvidaci poškozených částí buňky. V důsledku toho dochází k translokaci signálních molekul do jádra. Tyto signální molekuly mohou v jádře zastavit buněčný růst, a naopak indukují proliferaci mitochondrií a amplifikaci mitochondriální DNA (mtDNA) (Lee and Wei, 2005).

Nedávné studie ukazují na možnou roli ROS v mechanismu biogeneze mitochondrií. Bylo dokázáno, že ve stárnoucím kosterním svalstvu koreluje vzrůstající koncentrace ROS s nárůstem mtDNA, což je doprovázeno zvýšeným počtem mitochondrií (Pesce et al., 2005). Dále byl prokázán souběžný nárůst intracelulární koncentrace ROS a exprese jaderného respiračního faktoru-1 (NRF-1, nuclear respiratory factor) a mitochondriálního transkripčního faktoru A (mtTFA) (Miranda et al., 1999), což podporuje teorii, že ROS hrají důležitou roli v signalizaci směřující z mitochondrií do jádra. V biogenezi mitochondrií mají tedy důležitou roli proteiny kódované v jádře. Tato buněčná odpověď na oxidační stres je zprostředkována PGC-1 α a NRF-1, jelikož exprese obou těchto proteinů vede k následnému vypořádání se s exogenními ROS (Wright et al., 2007).

Oxidační stres stimuluje signální dráhy vedoucí k aktivaci a zvýšené expresi PGC-1 α , jak je znázorněno na obr. 6. Té však předchází různé signální dráhy závislé na odlišných podmínkách vznikajících v buňce při cvičení. Během cvičení dochází ke snížení poměru ATP/AMP, čímž se aktivuje adenosinmonofosfátkináza (AMPK) (Zong et al., 2002). AMPK působí buď přímo, nebo nepřímo přes proteinkinázu IV závislou na Ca²⁺ a kalmulinu (CaMKIV) (Wu, 2002; Irrcher et al., 2009). Dále dochází při cvičení ke zvyšování hladiny Ca²⁺ v buňce, s čímž je spojená aktivace CaMKIV, kalcineurinu nebo eNOS. První dvě dráhy vedou přímo ke zvýšení exprese PGC-1 α , zatímco aktivovaná eNOS působí prostřednictvím dalších molekul. eNOS syntetizuje NO[•], který ovlivní aktivitu solubilní guanylátcyklázy. Ta zvýšením produkce cGMP stimuluje zvýšenou expresi PGC-1 α (Nisoli, 2003). PGC-1 α je tedy hlavním regulátorem mitochondriální biogeneze při cvičení

(Wu et al., 1999). PGC-1 α stimuluje expresi dalších transkripčních faktorů (NRF-1, NRF-2), které se podílejí na koordinaci exprese mitochondriálních genů, např. mtTFA. Gen pro mtTFA obsahuje vazebné místo pro NRF-1 a NRF-2, což mu umožňuje spojit expresi jaderných genů kódujících proteiny s transkripcí genů kódovaných mtDNA (Virbasius and Scarpulla, 1994).

Další potenciální signální dráha spouštěná oxidačním stresem, která vede ke stimulaci biogeneze mitochondrií, byla objevena v játrech (obr. 6). V této dráze je pomocí ROS aktivována fosfatidylinositol-3'kináza (PI3K)-proteinkináza B (Akt). Zapojení této dráhy v aktivaci NRF-1 bylo prokázáno zjištěním, že inhibice fosforylace PI3K a Akt měla za následek potlačení vazebné aktivity NRF-1. Tyto experimenty potvrzují, že biogeneze mitochondrií může být stimulována oxidačním stresem (Suliman, 2003).



Obr. 6 Dráhy signální transdukce účastníci se mitochondriální biogeneze v savčích buňkách, upraveno podle (Lee and Wei, 2005). Intracelulární hladiny Ca²⁺, cAMP, NO a poměr ATP/AMP jsou ovlivňovány cvičením, chladem, podáním cytokinů a mitochondriálním stresem. Tyto signální molekuly aktivují specifické proteiny a/nebo enzymy, které pro změnu

aktivují odlišné signální dráhy a způsobují expresi a/nebo aktivaci PGC-1 α . Zvýšená exprese a aktivita PGC-1 α stimuluje mitochondriální aktivaci náležitých transkripčních faktorů (např. NRF-1, NRF-2, mtTFA). Bylo prokázáno, že oxidační stres indukuje změny v množství mitochondrií a počtu kopií mtDNA. Nicméně zůstává nejasné, zda jsou odlišné signální dráhy zapojené v regulaci exprese PGC-1 α a mitochondriální biogenezi ovlivněné oxidačním stresem. Plné čáry označují zavedené signální dráhy, přerušované čáry reprezentují předpokládané signální dráhy. Použité zkratky: Akt, proteinkináza B; AMP, adenosinmonofosfát; AMPK, adenosinmonofosfátkináza; ATP, adenosintrifosfát; CaMKIV, proteinkináza IV závislá na Ca²⁺ a kalmodulinu; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; cGMP, cyklický guanosinmonofosfát; CREB, protein odpovědný za vazbu cAMP; eNOS, endotelová syntáza oxidu dusnatého; i, intracelulární; mtTFA, mitochondriální transkripční faktor A; NO, oxid dusnatý; NRF-1,2, jaderné respirační faktory-1,2; p38, p38 proteinkináza aktivovaná mitogenem; PGC-1 α , peroxizomální proliferací aktivovaný receptor gamma koaktivátor 1 α ; PI3K, fosfatidylinositol-3'kináza; PKA, proteinkináza A.

3.3.4 Hypertrofie svalů

Hypertrofie znamená, že tkáň roste pouhým zvětšováním se buněk, nikoliv jejich množením. Během cvičení se hypertrofie svalů účastní signální dráha, která zahrnuje inzulínu podobný růstový faktor-1 (IGF-1). Při aktivaci tohoto faktoru se také uplatňují ROS. IGF-1 je hormon, strukturně podobný inzulínu, který je velice důležitý při proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Vykonává různé tkáňově specifické funkce, například indukuje hypertrofii myocytů, zejména v aktivním svalstvu (Philippou et al., 2007). Nedávná studie na C2C12 myocytech prokázala roli ROS v regulaci IGF-1. V přítomnosti molekul H₂O₂ došlo k výraznému zvýšení fosforylace receptoru pro IGF-1 (IGF-1R) prostřednictvím aktivace IGF-1, zatímco při snižování H₂O₂ pomocí antioxidantů, byla jeho fosforylace značně zeslabena. Léčba antioxidanty inhibuje hypertrofii myocytů vyvolanou IGF-1, což dokazuje, že ROS jsou nezbytné pro IGF-1 vyvolanou hypertrofii myocytů *in vitro* (Handayaningsih et al., 2011). Na transgenních myších bylo dokázáno, že zvýšená exprese IGF-1 způsobila nárůst svalové hmoty, a naopak u myší s chybějícím IGF-1R byly svaly menší a měly redukovaný počet myofibril (Barbieri and Sestili, 2012).

Hypertrofie vyvolaná ROS byla pozorována také u kardiomyocytů. Pokud byly kardiomyocyty přechodně vystaveny mírné koncentraci H_2O_2 , došlo u nich k indukci hypertrofie (Chen et al., 2000). Hypertrofie srdečního svalu může být indukována různými signálními drahami, mitogenem-aktivovanou proteinkinázou (MAPK), proteinkinázou C (PKC) a kalcineurinem. Bylo prokázáno, že všechny tyto tři dráhy jsou zahrnuty v kontrole hypertrofie kardiomyocytů a fungují koordinovaně. ROS pravděpodobně spouští tyto signální dráhy, které vedou ke změně genové exprese a regulaci transkripce (Indira and Renuka, 2008).

Cvičení přechodně zvyšuje produkci ROS a některých zánětlivých cytokinů. Cytokiny odvozené ze svalů, nazývané také myokiny, jsou svojí funkcí odlišné od působení zánětlivých nebo protizánětlivých cytokinů. Tyto jsou zapojeny v metabolických signálních drahách. Prvním identifikovaným myokinem byl interleukin-6 (IL-6) (Ostrowski et al., 1998). Produkce IL-6 je stimulovaná svalovou kontrakcí související s oběma typy metabolismů, glukózovým i lipidovým (Carey, 2006; Glund et al., 2007). IL-6 je indukovaný dráhou závislou na Ca^{2+} (Weigert et al., 2007) a funguje skrze působení AMPK (Kelly et al., 2004). Další člen rodiny myokinů, leukemii inhibující faktor (LIF, leukemia inhibitory factor), byl nalezen v lidském kosterním svalstvu po protahovacím tréninku (strečink) *in vivo* (Broholm et al., 2008). LIF se podobně jako IL-6 účastní dráhy stimulující satelitní buňky. Myokin IL-15 (interleukin-15) byl identifikován jako anabolický faktor, který je vysoce exprimován především v kosterním svalstvu. Jeho zvýšená exprese byla pozorována v lidském kosterním svalstvu po pravidelném strečinku (Nielsen et al., 2007). Tyto skutečnosti ukazují, že myokiny jsou potenciální metabolické signální molekuly stimulující svalovou hypertrofii v odpovědi na strečink. Výše zmíněné myokiny se také mohou uplatňovat při hypertrofii po adaptaci na vytrvalostní trénink (Agarwal et al., 2009).

Rovnováha mezi produkcí ROS a funkcí antioxidantního ochranného systému se zdá být hlavním klíčem k mnoha adaptivním odpovědím srdečního a kosterních svalů. Z publikovaných výsledků vyplývá, že když je produkce ROS ideální (mírně vyšší než bazální úroveň), projeví se hypertrofická adaptivní odpověď. Pokud však hladina ROS několikanásobně převyšuje bazální úroveň a ochrannou antioxidantní kapacitu, dojde k atrofické odpovědi v podobě Duchennovy svalové dystrofie (Powers et al., 2007).

Závěr

Tělesné cvičení je považováno za kardioprotektivní, protože chrání srdce před I/R poškozením. Při cvičení se tvoří ROS a může docházet k mírnému oxidačnímu stresu v důsledku nerovnováhy mezi jejich produkcí a odstraňováním prostřednictvím antioxidantního systému. ROS jako signální molekuly se podílejí na adaptačních procesech v podobě zvýšené antioxidantní kapacity, stimulace angiogeneze, zvýšené biogeneze mitochondrií nebo fyziologické hypertrofie svalů vedoucích k zlepšené ochraně srdce. Adaptované srdce se tak může lépe bránit náhlému oxidačnímu stresu, vzniklému například při I/R ataku.

Známky adaptace vznikající po cvičení se objevují již po prvním tréninku, ale rychle mizí, vydrží maximálně hodiny. Pravidelné cvičení nabízí přirozený způsob, jak si trvale udržet zvýšenou ochranu srdce. I zde je však hranice, za kterou již cvičení neposkytuje ochranu, ale naopak organizmu škodí. Zejména u netréňovaného jedince může vznikající oxidační stres způsobit rozsáhlá poškození. Míra zátěže je pro každého jedince individuální a neměla by se překročit. Předmětem dalšího výzkumu by mělo být prozkoumání přesného mechanismu vzniku ROS při cvičení a jejich role v kardioprotektivních signálních drahách. Také je třeba objasnit, jaký druh, délka a frekvence v opakování cvičebního tréninku jsou pro daného jedince nejvhodnější k získání maximálních výhod ze cvičení. Nové poznatky by mohly vést ke zlepšení prevence a léčby řady onemocnění, zejména kardiovaskulárních.

Použitá literatura

- Adlam, V.J., Harrison, J.C., Porteous, C.M., James, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P., and Sammut, I.A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal* 19, 1088–1095.
- Agarwal, D., Haque, M., Sriramula, S., Mariappan, N., Pariaut, R., and Francis, J. (2009). Role of Proinflammatory Cytokines and Redox Homeostasis in Exercise-Induced Delayed Progression of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 54, 1393–1400.
- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J.A., Córdova, A., and Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology and Behavior* 84, 1–7.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357, 593–615.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., Allen, D.G., and Westerblad, H. (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of Physiology* 509, 565–575.
- Arany, Z., Foo, S.-Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., et al. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 451, 1008–1012.
- Barbieri, E., and Sestili, P. (2012). Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *Journal of Signal Transduction* 2012, 1–17.
- Billman, G.E., Hallaq, H., and Leaf, A. (1994). Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by omega 3 fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 4427–4430.
- Bolli, R., Shinmura, K., Tang, X.-L., Kodani, E., Xuan, Y.-T., Guo, Y., and Dawn, B. (2002). Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovascular Research* 55, 506–519.
- Broholm, C., Mortensen, O.H., Nielsen, S., Akerstrom, T., Zankari, A., Dahl, B., and Pedersen, B.K. (2008). Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 586, 2195–2201.
- Brown, D.A. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *The Journal of Physiology* 569, 913–924.
- Carey, A.L. (2006). Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* 55, 2688–2697.
- Castier, Y. (2005). p47phox-Dependent NADPH Oxidase Regulates Flow-Induced Vascular Remodeling. *Circulation Research* 97, 533–540.

- Costa, A.D.T. (2005). The direct physiological effects of mitoK_{ATP} opening on heart mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290, 406–415.
- Demirel, H.A., Powers, S.K., Zergeroglu, M.A., Shanely, R.A., Hamilton, K., Coombes, J., and Naito, H. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology* 91, 2205–2212.
- Dickson, E.W., Hogrefe, C.P., Ludwig, P.S., Ackermann, L.W., Stoll, L.L., and Denning, G.M. (2007). Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 294, 402–408.
- Erickson, J.R., Joiner, M.A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., and Aykin-Burns, N. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462–474.
- Glund, S., Deshmukh, A., Long, Y.C., Moller, T., Koistinen, H.A., Caidahl, K., Zierath, J.R., and Krook, A. (2007). Interleukin-6 Directly Increases Glucose Metabolism in Resting Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 56, 1630–1637.
- Gomes, E.C., Silva, A.N., and Oliveira, M.R. de (2012). Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012, 1–12.
- Gustafsson, T., Puntschart, A., Kaijser, L., Jansson, E., and Sundberg, C.J. (1999). Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 276, 679–685.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press Inc., ISBN: 978-0-19-856868-1
- Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 505–513.
- Handayaningsih, A.-E., Iguchi, G., Fukuoka, H., Nishizawa, H., Takahashi, M., Yamamoto, M., Herningtyas, E.-H., Okimura, Y., Kaji, H., Chihara, K., et al. (2011). Reactive Oxygen Species Play an Essential Role in IGF-I Signaling and IGF-I-Induced Myocyte Hypertrophy in C2C12 Myocytes. *Endocrinology* 152, 912–921.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., and Ji, L. (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 442, 426–434.
- Hung, L.-M., Chen, J.-K., Huang, S.-S., Lee, R.-S., and Su, M.-J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research* 47, 549–555.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Wu, Y., and Bahl, J.J. (2000). Hydrogen Peroxide Dose Dependent Induction of Cell Death or Hypertrophy in Cardiomyocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 242–248.
- Chen, Z., Siu, B., Ho, Y.-S., Vincent, R., Chua, C.C., Hamdy, R.C., and Chua, B.H.L. (1998). Overexpression of MnSOD Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Transgenic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30, 2281–2289.

- Indira, K.A., and Renuka, R.N. (2008). Multiple signaling pathways coordinately mediate reactive oxygen species dependent cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Biochemistry and Function* 26, 346–351.
- Irrcher, I., Ljubcic, V., and Hood, D.A. (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 296, 116–123.
- Ishikawa, T., Esterbauer, H., and Sies, H. (1986). Role of Cardiac Glutathione Transferase and of the Glutathione S-Conjugate Export System in Biotransformation of 4-Hydroxynonenal in the Heart. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 1576–1581.
- Ji, L.L. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *The FASEB Journal* 18, 1499–1506.
- Ji, L.L., and Leichtweis, S. (1997). Exercise and Oxidative Stress: Sources of Free Radicals and Their Impact on Antioxidant Systems. *Age* 20, 91–106.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of theCBP/p300 coactivator by the hypoxia-induciblefactor-1 α . *The EMBO Journal* 17, 6573–6586.
- Kelly, M., Keller, C., Avilucea, P.R., Keller, P., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Hidalgo, J., Saha, A.K., Pedersen, B.K., et al. (2004). AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 449–454.
- Kolář, F., and Ošťádal, B. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiological Research* 53, 3–13.
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., and Tada, M. (1993). Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circulation Research* 72, 1293–1299.
- Laughlin, M.H., Oltman, C.L., and Bowles, D.K. (1998). Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 30, 352–360.
- Lee, H.-C., and Wei, Y.-H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37, 822–834.
- Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., and Yellon, D.M. (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88, 1264–1272.
- Marini, M., Lapalombella, R., Margonato, V., Ronchi, R., Samaja, M., Scapin, C., Gorza, L., Maraldi, T., Carinci, P., Ventura, C., et al. (2007). Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile. *European Journal of Applied Physiology* 99, 503–510.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: An Enzymic Function For Erythrocyte (Hemocytin). *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6049–6055.
- Mehta, H.B., Popovich, B.K., and Dillmann, W.H. (1988). Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinase M. *Circulation Research* 63, 512–517.

- Miranda, S., Foncea, R., Guerrero, J., and Leighton, F. (1999). Oxidative Stress and Upregulation of Mitochondrial Biogenesis Genes in Mitochondrial DNA-Depleted HeLa Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258, 44–49.
- Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L.L., and Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European Journal of Applied Physiology* 84, 1–6.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- Nielsen, A.R., Mounier, R., Plomgaard, P., Mortensen, O.H., Penkowa, M., Speersneider, T., Pilegaard, H., and Pedersen, B.K. (2007). Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition. *The Journal of Physiology* 584, 305–312.
- Nisoli, E. (2003). Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide. *Science* 299, 896–899.
- Okada, K.-I. (2004). Prolonged Endoplasmic Reticulum Stress in Hypertrophic and Failing Heart After Aortic Constriction: Possible Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circulation* 110, 705–712.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., and Pedersen, B.K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *The Journal of Physiology* 508, 949–953.
- Ošťádal, B., and Kolář, F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 158, 224–236.
- Park, K.-J., Kim, Y.-J., Kim, J., Kim, S.M., Lee, S.Y., Bae, J.-W., Hwang, K.-K., Kim, D.-W., and Cho, M.-C. (2012). Protective Effects of Peroxiredoxin on Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes. *Korean Circulation Journal* 42, 23–32.
- Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Lezza, A.M., Cantatore, P., and Gadaleta, M.N. (2005). Age-related changes of mitochondrial DNA content and mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in rat hind-limb skeletal muscles. *The Journals of Gerontology: Biological Sciences* 60, 715–723.
- Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M., and Koutsilieris, M. (2007). Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *Journal Musculoskelet Neuronal Interact* 7, 208–218.
- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 88, 1243–1276.
- Powers, S.K., Lennon, S.L., Quindry, J., and Mehta, J.L. (2002). Exercise and cardioprotection. *Current Opinion in Cardiology* 17, 495–502.
- Powers, S.K., Kavazis, A.N., and McClung, J.M. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* 102, 2389–2397.

- Powers, S.K., Talbert, E.E., and Adhietty, P.J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 589, 2129–2138.
- Reid, M.B. (2008). Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 169–179.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B.A. (1994). Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 26066–26075.
- Sen, C.K. (1999). Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Molecular and Cellular Biochemistry* 196, 31–42.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843–845.
- Scheele, C., Nielsen, S., and Pedersen, B.K. (2009). ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20, 95–99.
- Suliman, H.B. (2003). Lipopolysaccharide Stimulates Mitochondrial Biogenesis via Activation of Nuclear Respiratory Factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41510–41518.
- Štípek, S. a kolektiv (2000). Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha: Grada Publishing spol s.r.o., ISBN: 80-7169-704-4
- Tauler, P., Gimeno, I., Aguilo, A., Guix, M.P., and Pons, A. (1999). Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 438, 782–787.
- Thompson, P.D., Buchner, D., Piña, I.L., Balady, G.J., Williams, M.A., Marcus, B.H., Berra, K., Blair, S.N., Costa, F., Franklin, B., et al. (2003). Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease A Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107, 3109–3116.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B.S.S., Karoui, H., Tordo, P., and Pritchard, K.A. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9220–9225.
- Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1309–1313.
- De Waard, M.C., van der Velden, J., Boontje, N.M., Dekkers, D.H.W., van Haperen, R., Kuster, D.W.D., Lamers, J.M.J., de Crom, R., and Duncker, D.J. (2009). Detrimental effect of combined exercise training and eNOS overexpression on cardiac function after myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 296, 1513–1523.

- Weigert, C., Dufer, M., Simon, P., Debre, E., Runge, H., Brodbeck, K., Haring, H.U., and Schleicher, E.D. (2007). Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 293, 1139–1147.
- Wright, D.C., Han, D.-H., Garcia-Roves, P.M., Geiger, P.C., Jones, T.E., and Holloszy, J.O. (2007). Exercise-induced Mitochondrial Biogenesis Begins before the Increase in Muscle PGC-1 α Expression. *Journal of Biological Chemistry* 282, 194–199.
- Wu, H. (2002). Regulation of Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle by CaMK. *Science* 296, 349–352.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., and Scarpulla, R.C. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124.
- Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S., Kuzuya, T., Hori, M., Taniguchi, N., Kamada, T., and Tada, M. (1994). Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *Journal of Clinical Investigation* 94, 2193–2199.
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 285, 579–588.
- Zong, H., Ren, J.M., Young, L.H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M.J., and Shulman, G.I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15983–15987.