

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Nikola Kružiková

Netřesová termogeneze - UCP1 a další alternativní mechanismy

Non-shivering thermogenesis - UCP1 and other alternative mechanisms

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Zouhar, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Zouharovi, Ph.D. za odborné vedení, velkou ochotu a poskytnutí cenných rad a informací při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům oddělení Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu Akademie Věd České republiky za jejich čas a podporu.

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, 5.6. 2021

Nikola Kružíková

Abstrakt

Adaptivní termogeneze je přirozený mechanismus, kterým endotermní organismy cíleně zvyšují svůj bazální metabolický obrat za účelem udržení stálé tělesné teploty.

Při akutním vystavení subtermoneutrálním teplotám je první reakcí organismu třes, který je postupně nahrazován netřesovou termogenezí. Netřesová termogeneze u savců je nejčastěji spojována s proteinem UCP1, který se vyskytuje ve vnitřní mitochondriální membráně buněk tukové tkáně. UCP1 v aktivním stavu odpřahuje dýchací řetězec od syntézy ATP, a tím umožňuje významné navýšení metabolického obratu.

Kromě UCP1 se uvažuje i o alternativních mechanismech netřesové termogeneze – zejména o sarkolipinem zprostředkovaném odpřažení hydrolyzy ATP od čerpání vápenatých iontů pumpou SERCA v kosterních svalech, o hydrolyze kreatinfosfátu v tukové tkáni či o „prázdném“ cyklování triacylglycerolů a zpětné re-esterifikaci mastných kyselin. Důkazy o významnějším zapojení těchto mechanismů do adaptivní netřesové termogeneze jsou však většinou pouze nepřímé a dosud nejednoznačně přijímané.

Detailnější porozumění procesům netřesové termogeneze přitom zůstává v centru pozornosti, protože slibuje odhalit potenciální cíle pro farmakologickou manipulaci energetického výdeje a tím otevřít nové cesty k redukci obezity a s ní spojených zdravotních komplikací.

Klíčová slova: Netřesová termogeneze, UCP1, hnědá tuková tkáň, sarkolipin, „brite“ adipocyty, kreatin.

Abstract

Adaptive thermogenesis is a natural mechanism by which endothermic organisms increase their basal metabolic rate to maintain stable body temperature.

During acute exposure to subthermoneutral temperatures, the first reaction of organism is shivering which is gradually replaced by nonshivering thermogenesis. Nonshivering thermogenesis in mammals is associated with a UCP1 protein located in the inner mitochondrial membrane in adipose cells. In active mode, UCP1 uncouples respiratory chain from ATP synthesis and by that significantly increases metabolic rate.

Apart from UCP1, some alternative mechanisms of nonshivering thermogenesis were suggested – namely: sarcolipin uncoupling ATP hydrolysis from pumping calcium ions through SERCA pump in skeletal muscle, phosphocreatine hydrolysis in adipose tissue or futile cycling of triacylglycerols and fatty acids reesterification. However, to date, there is rather indirect and not generally accepted evidence that these mechanisms contribute significantly to adaptive nonshivering thermogenesis.

Better understanding of the nonshivering thermogenesis processes would be of great clinical importance as it could allow identification of potential targets for pharmacological manipulation of energy expenditure and thus provide novel methods for reducing obesity and obesity-associated complications.

Keywords: Nonshivering thermogenesis, UCP1, brown adipose tissue, sarcolipin, „brite“ adipocytes, creatine.

Seznam zkratek

ACSL	Acyl-CoA syntetáza
ADP	Adenosindifosfát
AEE	Energetický výdej spojený s aktivitou (z angl. <i>Activity-associated Energy Expenditure</i>)
ATGL	Tuková triglyceridová lipáza (z angl. <i>Adipose Triglyceride Lipase</i>)
ATP	Adenosintrifosfát
β -GPA	Kyselina β -guanidinopropionová (z angl. <i>β-GuanidinoPropionic Acid</i>)
BAT	Hnědá tuková tkáň (z angl. <i>Brown Adipose Tissue</i>)
BMR	Bazální metabolický obrat (z angl. <i>Basal Metabolic Rate</i>)
cAMP	Cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
CK	Kreatin kináza (z angl. <i>Creatine Kinase</i>)
DEE	Energetický výdej při zpracování potravy (z angl. <i>Diet-induced Energy Expenditure</i>)
EMG	Elektromyografie
EPA	Kyselina eikosapentaenová (z angl. <i>Eicosapentaenoic Acid</i>)
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (redukovaná forma)
FDG	[¹⁸ F] fluoro-deoxyglukóza
FGF21	Fibroblastový růstový faktor 21 (z angl. <i>Fibroblast Growth Factor 21</i>)
HFD	Strava s vysokým obsahem tuku (z angl. <i>High Fat Diet</i>)
HSL	Hormon senzitivní lipáza
iBAT	Interskapulární hnědá tuková tkáň (z angl. <i>Interscapular Brown Adipose Tissue</i>)
IP3R	Inositol-1,4,5-trifosfátový receptor
Mi-CK	Mitochondriální kreatin kináza
MK	Mastné kyseliny
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
OA	Kyseliny olejová (z angl. <i>Oleic acid</i>)
PET/CT	Pozitronová emisní tomografie/počítačová tomografie
PLB	Fosfolamban (z angl. <i>Phospholamban</i>)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)
REE	Klidový energetický výdej (z angl. <i>Resting Energy Expenditure</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RyR	Ryadinový receptor
SERCA pumpa	Ca ²⁺ -ATPáza sarko/endoplasmatického retikula (z angl. <i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>)
SLN, Sln	Sarkolipin – jako protein (SLN) a jako gen (Sln)
TAG	Triacylglycerol
TEE	Celkový energetický výdej (z angl. <i>Total Energy Expenditure</i>)
UCP, Ucp	Odpřahovací protein (z angl. <i>Uncoupling protein</i>) – jako protein (UCP) a jako gen (Ucp)
WAT	Bílá tuková tkáň (z angl. <i>White Adipose Tissue</i>)

Obsah

1. Úvod	1
2. Energetický výdej a termogeneze	3
3. Netřesová termogeneze závislá na UCP1	6
3.1. Hnědá tuková tkáň.....	6
3.2. Hnědnutí bílé tukové tkáně.....	7
3.3. UCP1 a jeho ortology	8
3.3.1. Další UCP	11
3.4. Metody zkoumání termogeneze a jejich limity.....	13
3.5. Význam BAT a hnědnoucí WAT pro energetický výdej u hlodavců a lidí	14
4. Alternativní mechanismy netřesové termogeneze	16
4.1. Jak prokázat existenci alternativních mechanismů	16
4.2. Kreatin	17
4.3. Sarkolipin.....	19
4.4. „Prázdné“ TAG/MK cyklování.....	22
5. Závěr	24
6. Použitá literatura.....	25

1. Úvod

Termogeneze (neboli tvorba tepla) představuje významnou složku energetického výdeje každého jedince. Stimulace termogeneze (ať už chladovou expozicí nebo farmakologicky) by mohla být cestou ke zvýšení celkového energetického výdeje, což je cesta se značným terapeutickým potenciálem. Dlouhodobá nerovnováha mezi energetickým příjmem a výdejem způsobuje ukládání nadbytečné energie ve formě triacylglycerolů (**TAG**) hromaděných zejména v tukové tkáni, což vede k rozvoji obezity. Mezi příčiny současného nárůstu prevalence obezity můžeme počítat jak celkové snižování energetického výdeje (např. snížení fyzické aktivity spojené se sedavým životním stylem), tak i zvyšování energetického příjmu (přejídání, nevhodná skladba potravy), popř. narušení cirkadiánního rytmu (např. nedostatek spánku) a další vlivy. Ke zdravotním rizikům úzce spojeným s obezitou patří komorbidity jako diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění (např. hypertenze, arytmie) a zvýšená pravděpodobnost výskytu určitých typů zhoubných nádorů. Nebezpečí spojená s obezitou jsou dále zvýrazněna v současné situaci pandemie Covid-19, kdy se ukazuje, že nadváha a obezita rozhodujícím způsobem komplikují průběh tohoto onemocnění (Gao et al., 2020).

Závažnost problému obezity je patrná už z letmého pohledu do statistik. V České republice bylo v letech 2008-2009 až 35 % dospělých občanů obézních a dalších 23 % trpělo nadváhou (Matoulek et al., 2010). Tato alarmující čísla dále stoupají a obezita zároveň zasahuje stále nižší ročníky. Obezita přitom už zdaleka není problémem jen ve vyspělých zemích. V roce 2019 nadváhou podle Světové zdravotnické organizace trpělo 38 milionů dětí ve věku do 5 let (World Health Organization, 2020).

Nejúčinnějším, avšak často obtížně realizovatelným přístupem k léčbě obezity je důsledná úprava životního stylu. Vedle toho je možné využít omezenou paletu farmak, v odůvodněných případech pak i metody bariatrické chirurgie. Všechny tyto doplňkové metody jsou zaměřeny zejména na snižování energetického příjmu. Léčiva typu sibutraminu (James et al., 2000) a lorcaserinu (Martin et al., 2011) vykazují centrální anorexigenní účinek, zatímco orlistat (Xenical) snižuje vstřebávání lipidů inhibicí trávicích enzymů (konkrétně pankreatických lipáz) (Torgerson et al., 2004). Problémem většiny dostupných léků jsou však jejich možné nežádoucí vedlejší účinky. Objevují se např. obavy, zda orlistat nezvyšuje možnost výskytu akutního poškození jater (Weir et al., 2011; Douglas et al., 2013). Sibutramin byl již v řadě zemí stažen z prodeje kvůli zvýšenému kardiovaskulárnímu riziku (Wynne et al., 1995).

Oproti výše zmíněným střídavým úspěchům strategie snižování energetického příjmu, potenciál farmakologické stimulace energetického výdeje zůstává v klinické praxi téměř nevyužit. V preklinické rovině však probíhá výzkum četných molekul, které by případně mohly mimikovat příznivé účinky cvičení nebo chladové expozice na energetický výdej a celotělový metabolismus (viz kapitoly 3. a 4.). V tomto směru poutá značnou pozornost stimulace hnědé tukové tkáně (*brown adipose tissue* – **BAT**), schopné rychlého spalování velkého množství sacharidů a lipidů díky unikátnímu odpřahovacímu proteinu 1 (*uncoupling protein 1* - **UCP1**), který odpřahuje mitochondriální oxidaci energetických substrátů od syntézy ATP a uvolňuje veškerou energii ve formě tepla (viz podrobněji kapitola 3.1.). Díky tomuto mechanismu může BAT, navzdory své drobné velikosti, v rozhodující míře určovat celkový energetický výdej a tím i energetickou bilanci (Rehmark et al., 1992).

Reálné možnosti tohoto termogenního mechanismu v boji s obezitou přitom už v meziválečném období prokázalo účinné nasazení 2,4-dinitrofenolu, který zvyšuje metabolický obrat rovněž odpřažením mitochondrií, tentokrát však neselektivně ve všech orgánech těla. Tato látka byla záhy stažena pro četné vedlejší účinky (Masserman & Goldsmith, 1934). Cílené odpřažení mitochondrií pouze v tkáních, které jsou k tomu fyziologicky adaptovány (jako je BAT), by však teoreticky mohlo dosáhnout podobných antiobezogenních účinků jako 2,4-dinitrofenol. Proto bude mechanismu odpřažení oxidativní fosforylace prostřednictvím proteinu UCP1 věnován prostor v kapitole 3.3.

Zatímco tematika UCP1 dominovala výzkumu termogeneze v posledních 20 letech, v současnosti se objevují pokusy prokázat existenci dalších netřesových mechanismů termogeneze na UCP1 nezávislých. Této problematice bude věnována celá kapitola 4.

Pochopení fyziologie termogenních procesů a jejich případná manipulace představují do budoucna jednu z nadějných a dosud nevyužitých cest k řešení problému celosvětové epidemie obezity a s ní spojených poruch.

2. Energetický výdej a termogeneze

Udržování životních funkcí vyžaduje neustálý přísun energie v podobě redukovaných makromolekul, zejména sacharidů, lipidů a proteinů v potravě. Energie uvolňovaná oxidací těchto živin je využívána pro pohon endergonických biochemických a molekulárně biologických pochodů. Tyto procesy principiálně nemohou probíhat s absolutní účinností a velká část energie se při nich proto ztrácí ve formě tepla. Tento bazální metabolický obrat (*basal metabolic rate* – **BMR**) tak představuje obligátní zdroj tepla. Některé (tzv. endotermní) organismy (zejména savci a ptáci) mohou nad rámec BMR cíleně vytvářet dodatečné teplo speciálními procesy (fakultativní termogenezí) a mohou tímto způsobem stabilně udržovat optimální tělesnou teplotu (tzv. homoiotermie) (McMurray et al., 2014; Cannon & Nedergaard, 2011).

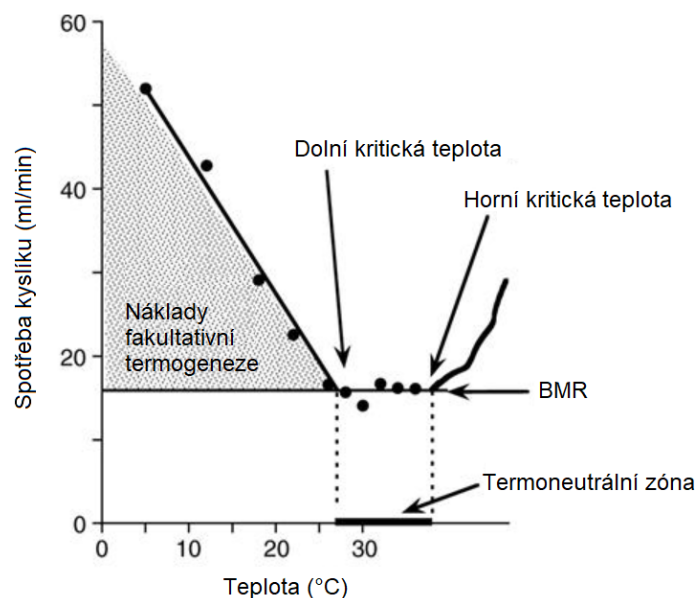
V určitém rozmezí vnějších teplot, které nazýváme termoneutrální zónou, je obrat bazálního metabolismu sám o sobě dostatečný pro udržení stálé tělesné teploty (viz podrobněji níže) a není tak vyvíjena žádná fakultativní termogeneze. BMR, jak byl popsán výše, se za těchto podmínek rovná klidovému energetickému výdeji (*resting energy expenditure* - **REE**) a můžeme ho definovat jako energetický výdej v klidu (tedy za nulového energetického výdeje spojeného s fyzickou aktivitou – **AEE**, *activity-associated energy expenditure*), s určitým odstupem po posledním příjmu potravy (u člověka cca 12 h, tedy energetický výdej ošetřený o energetický výdej spojený se zpracováním potravy a uložením živin – **DEE**, *diet-induced energy expenditure*) a v termoneutrální teplotě (tedy bez fakultativní termogeneze). V teplotách nižších, než je teplota termoneutrální zahrnuje REE homoiotermních organismů kromě BMR i náklady na dodatečnou fakultativní termogenezi (viz také obr. 1) (Cannon & Nedergaard, 2011).

Velikost REE a podíl REE na celkovém energetickém výdeji (*total energy expenditure* – **TEE**) závisí na řadě faktorů. Kromě výše zmíněné teploty prostředí, se velikost REE liší v závislosti na věku (s rostoucím věkem zvolna klesá), na pohlaví (v případě lidí se ženy vyznačují nižším REE, což je dáno vyšším podílem metabolicky neaktivní tukové tkáně na jejich tělesném složení) i na individuálních genetických predispozicích. V zásadě ale REE u člověka tvoří zhruba 60 % TEE (McMurray et al., 2014), AEE tvoří řádově 30 % (podíl ale velmi kolísá v závislosti na životním stylu) (Hopkins et al., 2019) a DEE se pohybuje okolo 10 % (v závislosti na druhu a množství potravy) (Morris et al., 2020).

U homoiotermních organismů je tělesná teplota udržována v úzkém rozmezí hodnot prostřednictvím ovlivňování rovnováhy mezi termogenezí a tepelnými ztrátami. Informace o teplotě těla je vyhodnocována termosenzitivními neurony v předním hypothalamu, který pak spouští jednotlivé mechanismy produkce a úspor tepla (Nakayama et al., 1963). Tepelné

ztráty jsou redukovány prostřednictvím izolační vrstvy na povrchu těla (srst, peří, možná i podkožní tuk, byť to není zdaleka jisté (Fischer et al., 2016)). Jak už bylo řečeno, v rámci termoneutrální zóny může být veškeré potřebné teplo pokryto prostým BMR. Při malých změnách teplot v rozmezí termoneutrální zóny je možné udržet stabilní tělesnou teplotu čistě změnami vlastností izolační vrstvy (při mírném ochlazení je např. možné zvětšit izolační vrstvu zježením srsti nebo změnou postojů, a navíc omezit tepelné ztráty stažením arteriol v kůži a podkoží). Není tedy nutné aktivovat termogenezi a energetický výdej zůstává minimální a v zásadě stabilní (viz termoneutrální zóna na obr. 1) (Chaplin et al., 2014).

Pokud okolní teplota poklesne pod dolní kritickou teplotu, BMR již k udržení stálé teploty nedostačuje, a je proto nutné aktivovat cílenou produkci tepla (čili fakultativní termogenezi). Energetický výdej pak roste nepřímo úměrně klesající teplotě (obr. 1). Podobně energetický výdej narůstá i při vzrůstu okolní teploty nad horní kritickou mez, protože za těchto podmínek je třeba tělesnou teplotu aktivně snižovat. Většina savců je obecně lépe přizpůsobena čelit teplotám pod dolní kritickou teplotou než nad horní kritickou teplotou (Cannon & Nedergaard, 2011).



Obr. 1: Závislost spotřeby kyslíku (úzce korelující s energetickým výdejem) na teplotě prostředí. Vyznačená termoneutrální zóna je typická pro myši (okolo 30 °C), mimo tuto zónu je k udržení stálé tělesné teploty nutný dodatečný energetický výdej nad rámec bazálního metabolického obratu BMR (při teplotách pod hodnotou dolní kritické teploty jde o náklady fakultativní termogeneze, nad horní kritickou teplotou o náklady cíleného ochlazení). Upraveno podle (Cannon & Nedergaard, 2011).

Existuje hned několik termogenních mechanismů, které mohou být využity v subtermoneutrálních teplotách. Klasickým mechanismem jsou mimovolné záškuby kosterního svalstva, neboli třes (*shivering*). Jako každá svalová kontrakce, i třes vyžaduje značné množství energie (ve formě ATP). Na rozdíl od klasické fyzické aktivity, která je rovněž vyvíjena zejména prostřednictvím činnosti kosterních svalů, ale rychlé střídání

kontrakcí a relaxací při třesu neslouží k vykonání žádné práce – drtivá většina energie je uvolněna jako teplo, čímž dochází k zahřívání organismu (Haman et al., 2005).

Třes je somatomotorická termogenní reakce, která je řízena předním hypothalamem (viz výše). Ten v případě potřeby aktivuje α -motoneurony inervující důležité svalové skupiny. Na nervosvalových ploténkách pak dochází k výlevu acetylcholinu z těchto nervových zakončení, který pak aktivuje nikotinové acetylcholinové receptory na svalové membráně (Klussmann et al., 1969).

Kromě třesu se v poslední době spekuluje i o roli svalu v netřesové termogenezi, související s homeostázou vápníkových iontů, jak o tom bude ještě pojednáno v kapitole 4.3. Z tohoto hlediska je důležité zdůraznit učebnicový poznatek, že výlev vápníku ze sarkoplasmatického retikula je nepostradatelnou součástí signalizační kaskády spouštějící svalovou kontrakci. Pro následnou relaxaci je klíčové, aby byl vápník z cytoplasmy navrácen zpět do sarkoplasmatického retikula, k čemuž slouží svalová Ca^{2+} -ATPáza (*sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase* – **SERCA** pumpa) (Haviv & Karlsh, 2013).

Svalová práce vede nevyhnutelně ke svalové únavě. K té jsou náchylná zejména rychlá glykolytická vlákna (typ II B). Systematická svalová námaha je proto spojená s posunem složení svalových vláken od typu II B k vytrvalejšímu typu I (Blondin et al., 2017). Takový posun je možno předpokládat i v případě soustavného vystavení organismu nízkým teplotám, kdy je vyžadován dlouhotrvající třes.

Přes určité možnosti adaptace není třes komfortním a dlouhodobě udržitelným prostředkem termogeneze při permanentním vystavení subtermoneutrálním teplotám. Anatomické uložení hlavních svalových skupin na tělesné periferii je navíc spojeno s tepelnými ztrátami (část tepla uniká do prostředí, aniž by přispěla k udržení tělesné teploty). Savci proto upřednostňují zapojení netřesové termogeneze (Aydin et al., 2008).

3. Netřesová termogeneze závislá na UCP1

Netřesová termogeneze je klasicky spojovaná s aktivitou výše zmíněného proteinu UCP1 v BAT. Mechanismu UCP1-závislé termogeneze v BAT bude věnována kapitola 3.3. Kromě klasické BAT se UCP1 ovšem vyskytuje i v tzv. běžové tukové tkáni o níž pojednává kapitola 3.2.

3.1. Hnědá tuková tkáň

Anatomické umístění BAT (u lidí zejména v okolí klíční kosti – v blízkosti hlavních tepen, u novorozenců a hlodavců v mezilopatkové oblasti) zajišťuje jednak dostatečné zásobení tohoto orgánu kyslíkem a termogenními substráty, ale také účinnou distribuci tepla do dalších částí těla (Becker et al., 2016). Další adaptace k účinné termogenezi vykazují samotné tukové buňky BAT (hnědé adipocyty). Obsahují velké množství drobných tukových kapének (jsou tzv. multilokulární), z jejichž velkého povrchu je v případě potřeby možné lipolýzou rychle uvolnit značné množství mastných kyselin (**MK**), které pak mohou sloužit jako potřebný zdroj energie. Typické je rovněž zvýšené zastoupení mitochondrií (obsahujících velké množství železo vázajících proteinů, jež dodávající tkáni nahnědlou barvu), v nichž mohou být energetické substráty včetně MK oxidovány a kde také probíhá klíčový krok netřesové termogeneze – odpáření dýchacího řetězce a fosforylace ADP prostřednictvím UCP1 (Young et al., 1984).

UCP1 se v evoluci objevuje u placentárních savců, některé linie (např. prasata, kozy či koně) však tento protein druhotně ztratily (Hou et al., 2017; Gaudry et al., 2017). Netřesová termogeneze je esenciální zejména u altriciálních mláďat (např. lidských novorozenců) kvůli jejich omezené tepelné izolaci a z počátku nedostatečné kapacitě pro svalový třes. Důležitý je tento proces rovněž u drobných savců, kteří vzhledem ke své velikosti a izolačním možnostem žijí neustále mimo svou termoneutralní zónu (např. laboratorní hlodavci) (Zhao et al., 2014). Třetí skupinou výrazně využívající funkci BAT jsou hibernující savci, zejména v okamžiku probuzení ze „zimního spánku“, tedy při návratu k vyšší tělesné teplotě (Gaudry et al., 2017).

Dospělý člověk se naproti tomu většinu času zdržuje ve své termoneutralní zóně (cca 20 °C pro lehce oblečeného člověka), takže BAT nevyhnutelně nepotřebuje (Cannon & Nedergaard, 2011). Rozsáhlá interskapulární BAT (**iBAT**) lidských novorozenců tak v průběhu dalšího života postupně atrofuje, je nahrazována klasickou bílou tukovou tkání bez UCP1 (Kotzbeck et al., 2018). Přesto byla funkční BAT překvapivě nalezena i u dospělých lidí (byť ne v interskapulární oblasti (van Marken Lichtenbelt et al., 2009)). Tento objev přivedl BAT do centra všeobecné pozornosti, neboť naznačil její využitelnost při terapii obezity a přidružených chorob u lidí.

Klasické výzkumné práce o termogenezi byly prováděny na krysách, které jsou vzhledem ke své velikosti oproti myším méně citlivé na chlad. Díky dostupnosti transgenních myší směřují ovšem moderní trendy k využití myšího systému. Dolní kritická teplota pro dospělé krysy je udávána do 24 °C, kdežto termoneutrální teplota myší je až okolo 30 °C (Obr.1). Rozdíly mezi termoneutrální zónou člověka a modelových laboratorních hlodavců jsou klíčovou a často nedoceňovanou okolností, na niž je třeba brát zřetel při interpretaci výsledků metabolických experimentů na hlodavcích (Cannon & Nedergaard, 2011).

3.2. Hnědnutí bílé tukové tkáně

V bílé tukové tkáni (**WAT**) za normálních okolností k expresi *Ucp1* prakticky nedochází. Obsah mitochondrií je relativně nízký a většinu objemu buňky zaujímá jedna velká tuková kapénka (buňky jsou tzv. unilokulární). U myší se ovšem za určitých podmínek mohou ve WAT objevit morfologicky a funkčně hnědé adipocyty (dojde k „hnědnutí“ bílé tukové tkáně). Takovéto hnědé buňky v bílé tkáni nazýváme „brite“ adipocyty (od *brown-in-white*) nebo též béžové buňky (což je odstín mezi hnědou a bílou/žlutou) (Xu et al., 2019).

Není přitom uspokojivě objasněno, zda jsou původ a funkce těchto béžových adipocytů stejné jako u standardní BAT, nebo zda se jedná o zcela odlišný buněčný typ. Jako prekurzory klasických hnědých adipocytů byly identifikovány tzv. myf5-pozitivní myoblastické buňky (Sanchez-Gurmaches et al., 2012), takže hnědé adipocyty BAT by na rozdíl od béžových adipocytů WAT mohly mít společný původ s myocyty. Novější výzkumy ale ukazují, že je celá problematika poněkud složitější a původ buněk i charakteristika jejich genové exprese se liší např. i v souvislosti s anatomickou lokalizací daného tukového depa (Rosell et al., 2014).

Otázka charakteru béžových tukových buněk je významná s ohledem na přetrvávající dohady o tom, zda je BAT nalezená u dospělých lidí analogická klasické hlodavčí BAT nebo spíše zhnědnuté béžové WAT. Oba typy adipocytů se shodují v klíčových vlastnostech (multilokularita, velké množství mitochondrií a exprese *Ucp1*) a patrně i svou termogenní funkcí (Bertholet et al., 2017). Na druhou stranu u béžové tkáně myší byly popsány některé mechanismy u hnědých adipocytů dříve neznámé (např. kreatinový cyklus – viz kapitola 4.2.). Zůstává tedy otázkou, zda tyto procesy údajně specifické pro béžovou tukovou tkáň můžeme očekávat i u člověka.

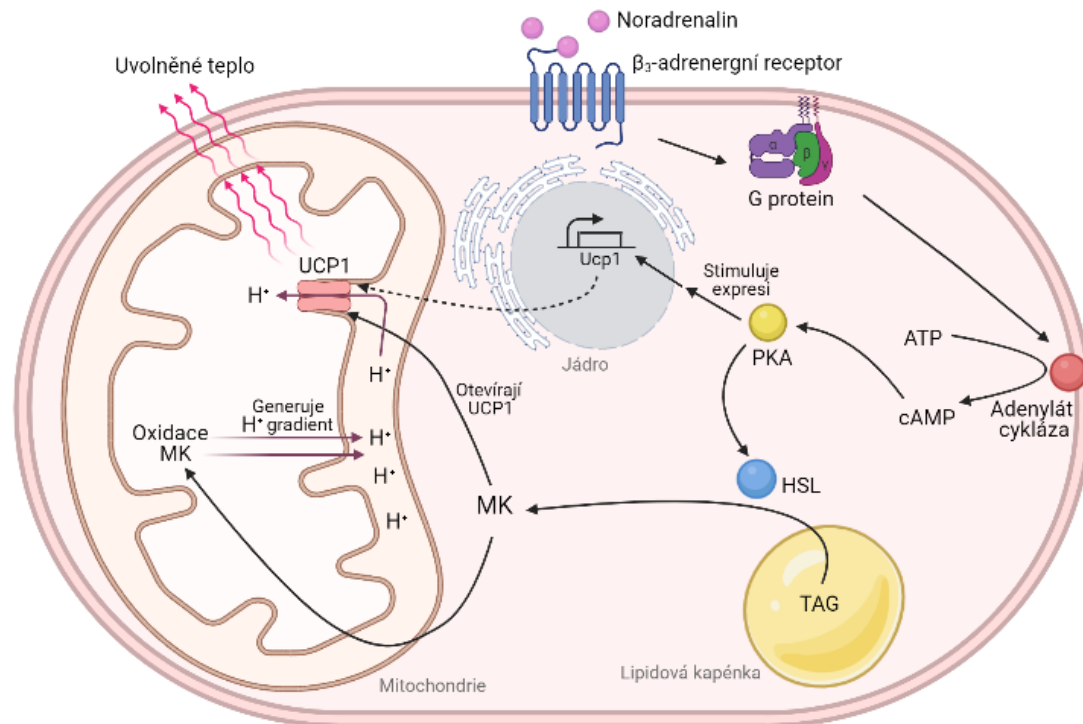
Stimulem vedoucím k aktivaci BAT a k hnědnutí WAT je zejména dlouhodobější vystavení nízkým teplotám (kolem 4 °C) (Xu et al., 2019). Podobné účinky na WAT má opakované podávání agonistů β_3 -adrenergických receptorů (např. CL 316,243 či noradrenalinu) (Granneman et al., 2003). Zvýšení hladiny termogenních markerů v tukové

tkáni (Cidea, β_3 -ar a UCP1) bylo popsáno také u obézních myší vystavovaných přerušovanému půstu (Marinho et al., 2020).

3.3. UCP1 a jeho ortology

Pokud mozek vyhodnotí potřebu adaptivní termogeneze, vyšle signál prostřednictvím sympatického nervstva do BAT a na nervových zakončeních dojde k výlevu noradrenalinu. Ten se váže zejména na β_3 -adrenergní receptory, čímž se spouští kaskáda zahrnující cAMP, proteinkinázu A a hormon senzitivní lipázu (**HSL**) (viz obr. 2) (Rehmark et al., 1992). HSL je jedním z klíčových lipolytických enzymů. Její aktivitou na povrchu tukových kapének dochází k hydrolýze zásobních TAG a k uvolňování MK. MK jednak slouží jako energetický substrát zajišťující genezi protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně (viz dále), jednak přímo aktivují (otevírají) kanál UCP1 pro protony (Jiménez-Jiménez et al., 2006). Kromě této akutní aktivace existujícího UCP1 vede adrenergní stimulace i ke zvýšení exprese genu *Ucp1*, takže v chladu narůstá celkové množství UCP1 v BAT i hnědnoucí WAT a dochází tak ke zvyšování oxidační a termogenní kapacity této tkáně (Wang et al., 2020).

β_3 -adrenergní receptory se vyskytují zejména v tukové tkáni (WAT i BAT). V menší míře jsou pak exprimovány v dalších orgánech, např. v močovém měchýři (Coelho et al., 2017). Jak bylo řečeno, adrenergní stimulace spouští v BAT lipolýzu a MK jsou pak oxidovány v mitochondriích. Rovněž ve WAT dochází po adrenergní stimulaci k uvolňování MK, ty jsou však vzhledem k omezené oxidační kapacitě WAT vyplavovány do krevního oběhu, kde pak slouží jako zdroj energie pro další orgány, včetně BAT (viz kapitola 4.4.).

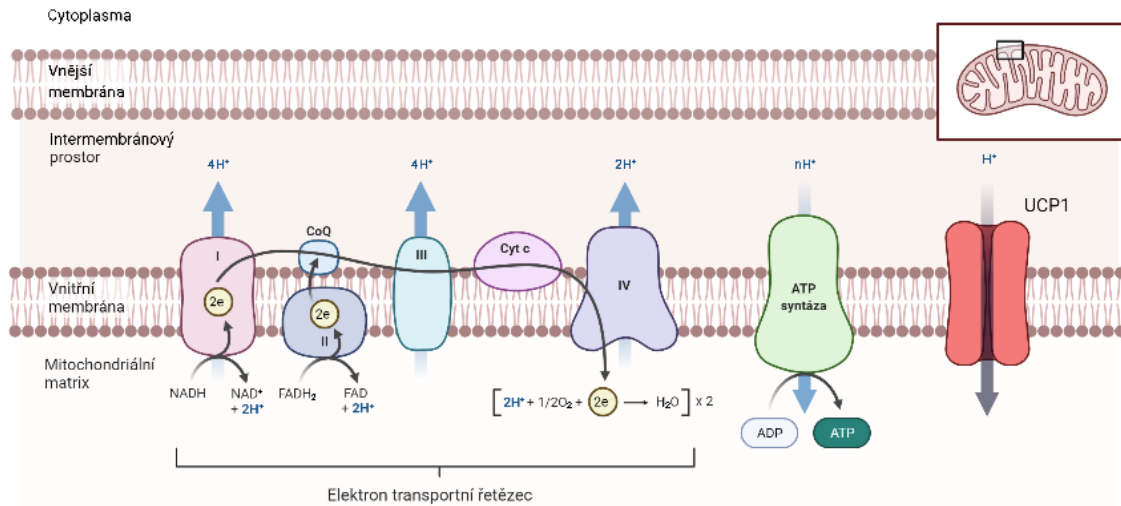


Obr. 2: Signalizace vedoucí k aktivaci odpřahovacího proteinu 1 (UCP1)

Z mozku je prostřednictvím sympatického nervstva vyslán signál do hnědé tukové tkáně. Na nervových zakončení dojde k výlevu noradrenalinu, který se váže na β_3 -adrenergní receptory, které aktivují G-proteiny hydrolyzou GTP. G-proteiny aktivují adenylátcyklázu, která přeměňuje ATP na cAMP, a cAMP poté aktivuje proteinkinázu A (PKA). Touto cestou je 1) stimulována exprese Ucp1 v jádře (chronické působení noradrenalinu proto vede k zvýšení hladin UCP1), a 2) stimulována lipolýza, což vede k nárůstu hladin MK. MK přímo otevírají UCP1, zároveň jsou ale v mitochondriích oxidovány, čímž pohání pumpování protonů elektron transportním řetězcem. Protony tlačené elektrochemickým gradientem přes UCP1 zpět do matrix mitochondrie jsou zdrojem tepla (viz také obr. 3) (Vytvořeno v programu BioRender).

MK jsou spolu s glukózou v BAT oxidovány mj. za vzniku molekul redukováných elektronových přenašečů NADH a FADH_2 , které poté předávají elektrony komplexům tzv. elektron-transportního (či dýchacího) řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně. Elektrony poté prochází tímto řetězcem od nejredukovánějšího stavu k nejoxidovanějšímu, přičemž konečným akceptorem elektronu je molekula kyslíku a dochází tak ke vzniku vody (viz obr. 3). Při průchodu elektronů přes komplexy I, III a IV dochází k pumpování protonů z matrix mitochondrie do intermembránového prostoru. Pro výrobu ATP je potřeba, aby tyto protony prošly skrz ATP syntázu (Voet & Voet, 2015). V mitochondriích BAT je však oproti ostatním tkáním velice nízká aktivita ATP syntázy (Kramarova et al., 2008). Místo ní se zde vyskytuje UCP1, který v membráně tvoří uzavíratelný pór, kterým mohou nahromaděné protony přecházet z intermembránového prostoru zpět do matrix. Místo použití protonového gradientu k produkci ATP dochází k prázdným cyklům zesílené oxidace substrátu a tvorby tepla. Elektron transportní řetězec je tedy prostřednictvím UCP1 odpřažen od ATP syntázy (Cannon & Nedergaard, 2011). Jak už bylo naznačeno, UCP1 kanál je v základním stavu uzavřen. Je totiž inhibován purinovými nukleotidy, jejichž di- a trifosfátové formy jsou vázány na arginin (R83, R182 a R276), čímž se UCP1 dostává do konformace, která znemožňuje

transport protonů (Modrianský et al., 1997). Vazba MK naopak UCP1 kanál otevírá. Proto k odpřažení oxidativní fosforylace dochází po adrenergní stimulaci, kdy jsou hladiny MK v buňce zásluhou nastartované lipolýzy zvýšené.



Obr. 3: Odpřahování buněčného dýchání od ATP syntézy 1 pomocí UCP1

Při oxidaci energetických substrátů vznikají mj. redukované elektronové přenašeče, které předávají své elektrony do elektron transportního řetězce, kde je pak jejich energie částečně využita k pumpování protonů proti jejich elektrochemickému gradientu do mezimembránového prostoru. Ve většině tkání a orgánů tyto protony prochází zpět do matrix ATP syntázou, kde pohání tvorbu ATP z ADP a fosfátu. V hnědé tukové tkáni se nachází UCP1 – alternativní kanál propouštějící protony za uvolňování tepla. (Vytvořeno v programu BioRender)

Vedle adrenergní stimulace je činnost BAT zvyšována mj. i pomocí hormonů štítné žlázy, především trijodthyroninu. Při podávání trijodthyroninu u myši dochází k redukcí tělesné hmotnosti a zvýšené rychlosti energetického výdeje. Chronické podávání vedlo k aktivaci BAT a k hnědnutí inguinální WAT (Alvarez-Crespo et al., 2016). Expresi Ucp1 zvyšuje rovněž chronické podávání endogenního hormonu fibroblastového růstového faktoru (*Fibroblast growth factor 21 - FGF21*). FGF21 je nejvíce exprimován v játrech a pankreatu (Nishimura et al., 2010). FGF21 neovlivňuje příjem potravy, ale udržuje tělesnou teplotu (Ameka et al., 2019), pomáhá proti systémové inzulinové rezistenci (Li et al., 2018), usnadňuje ukládání MK do tukové tkáně (Schlein et al., 2016) a zejména zvyšuje energetický výdej (Xu et al., 2009). Ukázalo se však, že FGF21 vykazuje antiobezogenní účinek i u myši s ablací genu Ucp1. Zvýšení energetického výdeje tak patrně není zprostředkováno činností BAT. Mechanismus účinku zůstává stále nejasný (Keipert et al., 2020).

3.3.1. Další UCP

UCP1 spolu s dalšími 5 proteiny (číslovanými UCP2-6) patří do rodiny UCP (*uncoupling proteins*). Všechny tyto proteiny přenášejí ionty přes mitochondriální membránu.

UCP2 má 59% aminokyselinovou shodu s UCP1 (Fleury et al., 1997), UCP3 je shodný (Boss et al., 1997) z 57 % s UCP1, UCP4 má podobnost s UCP1 okolo 30 % (Mao et al., 1999) a UCP5 je z 39 % shodný s UCP3 a UCP4 (Yu et al., 2000). Z důvodu těchto podobností se původně mělo za to, že by ostatní proteiny z UCP rodiny mohly rovněž odpřahovat oxidativní fosforylaci a hrát tak roli v termogenezi.

Vysoké hladiny UCP2 se nachází v srdci, WAT, ale především v pankreatických ostrůvcích – v β -buňkách. UCP2 je negativní regulátor sekrece inzulínu, kterou významně ovlivňují i relativně malé změny hladin UCP2 (Zhang et al., 2001). Po inkubaci pankreatických ostrůvků v různých koncentracích glukózy bylo dokázáno, že ostrůvky, kterým chybí gen *Ucp2* ($Ucp2^{-/-}$), mají zvýšené koncentrace ATP oproti kontrolním ostrůvkům z kontrolních myší ($Ucp2^{+/+}$) a vylučují dvakrát až třikrát více inzulínu. UCP2 je tedy patrně negativní regulátor sekrece inzulínu stimulované glukózou. UCP2 na základě své aktivity úniku protonů a následného snížení produkce ATP negativně ovlivňuje schopnost β -buněk vylučovat inzulín v reakci na glukózu (Zhang et al., 2001). Další role pro UCP2 je regulace produkce reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species* – **ROS**) (Arsenijevic et al., 2000). Role UCP2 jako hlavního regulátoru netřesové termogeneze byla zamítnuta na základě pokusů, ve kterých byly $Ucp2^{-/-}$ myši vystaveny chladové adaptaci. Tato zvířata totiž vykazovala stejnou tělesnou teplotu jako $Ucp2^{+/+}$ myši a neměnila se jejich váha ani při stravě s vysokým obsahem tuku (*high fat diet* – **HFD**) (Enerbäck et al., 1997). Ztráta UCP2 však vede ke zvýšené glykolýze a omezuje možnosti metabolické adaptace na vystavení chladu, což naznačuje, že UCP2 v BAT je nezbytný pro podporu oxidačního metabolismu a adekvátní adaptaci v kontextu zvýšené energetické poptávky. Při absenci UCP2 myši využívají jako substrát po adrenergní stimulaci přednostně glukózu před neesterifikovanými MK, což je nežádoucí, neboť glykolýza oproti oxidaci MK vynášejí méně NADH a $FADH_2$ a může to ohrozit adaptaci na chlad (Caron et al., 2017). Z těchto pozorování vyplývá, že UCP2 hraje roli při výběru substrátů, ale nezpůsobuje odpřahování dýchání od fosforylace.

UCP3 se nachází v BAT, v srdci a nejvíce v kosterním svalstvu. Jelikož v BAT se nachází hlavně UCP1, předpokládalo se, že jeden protein dokáže nahradit druhý (Hilse et al., 2016). Avšak fenotyp myší s dvojitým knock-outem $Ucp1^{-/-}/Ucp3^{-/-}$ je nerozeznatelný od myší s ablací pouze *Ucp1*. Toto poznání vedlo k závěru, že UCP3 nemá rozhodující roli v termogenezi, neovlivňuje hladiny TAG, inzulínu, nesnižuje tělesnou váhu a nereguluje oxidaci MK (Gong et al., 2000) a ani nemá vliv na energetický výdej (Cline et al.,

2001). Přesto byl v mitochondriích kosterního svalu $Ucp3^{-/-}$ zvířat pozorován snížený únik protonů (Gong et al., 2000) a čtyřnásobně zvýšená syntéza ATP, tedy UCP3 oxidační fosforylaci skutečně odpřahoval (Cline et al., 2001). Za účelem sledování významu UCP3 pro fakultativní adaptivní termogenezi, byl UCP3 studován u myši s ablací UCP1 ($Ucp1^{-/-}$) myši vystavených chladu. Hladina UCP3 se u těchto zvířat nezvýšila, naopak se jeho hladina v BAT snížila, čímž byla definitivně vyvrácena hypotéza o vzájemné zastupitelnosti těchto proteinů (Hilse et al., 2016). Funkce UCP3 je dosud neznámá, ale je možné, že UCP3 funguje jako transportér rozpuštěných látek při netřesové termogenezi (Riley & Mills, 2020).

Naposledy objevené UCP4 a UCP5 jsou exprimovány v mozku, ale jejich role v termogenezi stále zůstává otázkou. Předpokládá se, že UCP4 i UCP5 regulují generování ROS, UCP5 transportuje z mitochondrie siřičitany (Gorgoglione et al., 2019; Mao et al., 1999).

UCP6 je exprimován v ledvinách, funguje jako mitochondriální přenašeč, který přenáší siřičitany a thiosírany z mitochondrie a stejně jako předchozí proteiny funguje jako regulátor ROS (Gorgoglione et al., 2019). Přestože UCP2, 3, 4, 5, 6 přenáší ionty, neexistují důkazy o tom, že by mohly sloužit k adaptivní termogenezi.

Netřesová termogeneze je tradičně spojována s UCP1, ale některé výzkumné skupiny prosazují myšlenku, že existují i další mechanismy, které jsou využívány pro cílené zahřívání organismů, které nemají UCP1. Golozoubova et al., (2001) uvádí důkazy, že při vyřazení UCP1 při studené expozici (4 °C) je potřebné teplo vyráběno třesem. Ani pokračující chladová expozice nevede k nahrazování třesu žádným alternativním mechanismem, takže u myši aklimatizovaných na 30 °C a 24 °C záhy dojde k energetickému vyčerpání. $Ucp1^{-/-}$ myši aklimatizované na 18 °C však vydrží v chladu až 4 měsíce. Jelikož nebyl znám důvod, proč se tomu tak děje a zda za to není zodpovědný nějaký alternativní mechanismus, provedli Golozoubova et al. měření elektrické aktivity svalu (*electromyography* – **EMG**). Podle předpokladu se myši netřásly, pokud byly umístěny v termoneutrální teplotě (30 °C). Kontrolní myši ($Ucp1^{+/+}$) akutně vystavené 4 °C se intenzivně třásly, spotřeba kyslíku se rapidně zvýšila a průměrná aktivita svalu byla třikrát vyšší než při 30 °C. Po aklimatizaci na chlad však $Ucp1^{+/+}$ myši z 4 °C měly stejnou aktivitu svalu jako skupina chovaná při 30 °C – třes tak u nich nahradila netřesová termogeneze. Na rozdíl od $Ucp1^{+/+}$ myší, $Ucp1^{-/-}$ myši se po aklimatizaci na 4 °C nepřestávaly třást a jejich primárním způsobem zahřívání byl třes ($Ucp1$ nebyl k dispozici). U těchto myší se tak netřesová termogeneze závislá na UCP1 jeví jako jediná alternativa k třesu (Golozoubova et al., 2001).

Někteří však prezentují nepřímé důkazy o existenci dalších, alternativních mechanismů pro netřesovou termogenezi (využití proteinu sarkolipinu a vápníkové pumpy SERCA, prázdné cyklování lipidů, kreatinu a další), jak bude popsáno v dalších kapitolách.

3.4. Metody zkoumání termogeneze a jejich limity

Informace o BAT získáváme pomocí celé palety experimentálních technik, z nichž každá má svá omezení. Jednak je možno zkoumat metabolickou aktivitu BAT, ale i obsah samotného UCP1.

Příjem metabolitů do BAT lze klasicky zobrazit např. pomocí pozitronové emisní tomografie/počítačové tomografie (**PET/CT**). PET zachycuje radioaktivní záření β , takže lze sledovat distribuci radioaktivní látky po těle (čili které tkáně jsou metabolicky aktivní a přijímají radioaktivně značenou sloučeninu). Jednou z mála jednoduše dostupných sloučenin pro PET je [^{18}F] fluoro-deoxyglukóza (**FDG**) (Chondronikola et al., 2015). Této sloučeniny v kombinaci s PET se běžně využívá při screeningu na nádory, které spotřebovávají velké množství glukózy, aby mohly rychle růst (Lee et al., 2017). BAT také spotřebovává mnoho glukózy, ale zároveň z krevního oběhu vychytává MK (hlavně lipidy). PET však dokáže pomocí FDG zobrazit pouze vstřebávání glukózy. Radiosloučeniny MK se běžně nepoužívají, protože je jejich příprava drahá. Z tohoto důvodu PET většinou podává pouze částečný obrázek o aktivitě BAT (Ouellet et al., 2012).

Další metodou je měření spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého nepřímou kalorimetrií. Výměna těchto dýchacích plynů totiž velmi úzce koreluje s energetickým výdejem (tvorbou tepla), přičemž energetický výdej je možné z těchto parametrů přímo odvodit pomocí empiricky sestavených rovnic (Ouellet et al., 2012). Pokud je po nějaké době měření bazálního metabolismu aplikován agonista β_3 -adrenergního receptoru, který mimikuje noradrenalin a aktivuje specifické β_3 -adrenergní receptory, odpovídá nárůst spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého z velké části aktivitě BAT (Szentirmai & Kapas, 2017). Jako agonista β_3 -adrenergního receptoru je používán u myší např. CL 316,243 (Grannemann et al., 2013), u lidí mirabegron (Cypess et al., 2015). Selektivita těchto agonistů je závislá na živočišném druhu a nikdy není zcela dokonalá. I když se aplikuje selektivní agonista β_3 -adrenergních receptorů, mohou se vyskytovat vedlejší účinky (vyvolané např. nárůstem hladiny MK v oběhu po aktivaci lipolýzy ve WAT) (Grujic et al., 1997).

V posledních letech se testuje měření pomocí pasivního radiometrického vyšetření. Oproti PET/CT se při této metodě nevyužívá potenciálně nebezpečné ionizační záření. Nevýhodou této metody je potřeba udržení radiometru neustále pod stejným úhlem, aby se neměnila jiná tkáň (Crandall et al., 2018).

K určení množství UCP1 v tkáni je nezbytné provést biopsii nebo nekropsii příslušné tkáně, což omezuje dostupnost tohoto typu vzorků zejména u lidí. Následně je možné určit množství UCP1 jednak na úrovni genové exprese (tedy množství Ucp1 mRNA pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (*quantitative polymerase chain reaction* – **qPCR**) nebo vhodné transkriptomické metody) či na úrovni hotového proteinu (pomocí Western blotu, imunohistochemie nebo proteomické analýzy). Výhodou qPCR je postižení rychle se měnící exprese Ucp1. Už krátké vystavení chladu vede k mnohonásobnému zvýšení množství mRNA (Rehmark et al., 1992), zatímco množství UCP1 proteinu se zvyšuje s jistým zpožděním. S tím jsou ale spojena jistá interpretační úskalí – čím nižší je původní hladina mRNA (metoda je velmi citlivá, schopná zaznamenat stopová množství mRNA), tím dramatictější se zdá její nárůst. Z tohoto důvodu se liší zvýšené hladiny mRNA mezi hnědou a béžovou tukovou tkání. V BAT se hladina mRNA po chladové adaptaci zvyšuje relativně méně, zatímco v béžové tukové tkáni se hladiny mRNA zvyšují až 200násobně. I když jsou hladiny mRNA několikanásobně vyšší, depoty béžové tukové tkáně dosahují pouze cca 10 % celkové klasické netřesové termogeneze (Nedergaard & Cannon, 2013). Samotné množství Ucp1 mRNA však termogenní kapacitě odpovídá jen nepřímo, protože ta závisí až na množství hotového proteinu. Pro zvýšené hladiny proteinu UCP1 je potřeba delší vystavení chladu (spíše v řádu dnů a týdnů). Stanovení UCP1 proteinu pomocí imunohistochemie nebo Western blotu vyžaduje spolehlivé specifické protilátky (Li et al., 2015).

3.5. Význam BAT a hnědnoucí WAT pro energetický výdej u hlodavců a lidí

BAT a hnědnoucí WAT jsou aktivovány chladovou stimulací a jejich aktivita má vliv na celotělový energetický výdej. Zde se zastavíme u otázky, nakolik je tento efekt významný.

Pokud se myši, které jsou aklimatizovány na 22 °C, přemístí do 10 °C, zvýší se jejich denní energetický výdej až o 48 %, zejména vlivem aktivace UCP1 (Vaanholt et al., 2009). Vedle chladu má vliv na aktivitu UCP1 i příjem většího množství lipidů. Ucp1^{+/-} myši adaptované na termoneutrální teplotu vykazovaly po měsíci krmení HFD dietou zvýšenou spotřebu kyslíku než myši krmené normální stravou. U Ucp1^{-/-} myší se spotřeba kyslíku krmením HFD neměnila (von Essen et al., 2017). Pokud je Ucp1^{-/-} myším, které jsou umístěné v 5 °C, injekčně podán agonista β_3 -adrenergního receptoru, sníží se jejich spotřeba kyslíku a rozvine se citlivost k chladu (dochází u nich k hypotermii), ale nedochází u nich k rozvoji obezity (Feldmann et al., 2009). Naopak u Ucp1^{-/-} myší, které jsou uchovávány v termoneutrální zóně, dochází k nabírání váhy (především tělesného tuku) u obou forem stravy přinejmenším částečně v důsledku zvýšené účinnosti metabolismu (tj. nižší míry odpáření mitochondrií). U Ucp1^{+/-} myší byl vlivem HFD čtyřnásobně zvýšen obsah UCP1. Termogeneze vyvolaná stravou, je tedy do značné míry závislá na přítomnosti UCP1 a je plně zprostředkována jeho aktivací. Aktivace UCP1 stravou může být maskována aktivací

UCP1 chladem. Plně se proto projeví pouze za termoneutrálních podmínek. Proto u $Ucp1^{-/-}$ myši dochází ke snížené spotřebě kyslíku a k obezitě vyvolané stravou (Feldmann et al., 2009).

Aktivace a výskyt BAT (popř. exprese $Ucp1$) byly zkoumány také u lidí, přestože možnosti takovýchto studií jsou ve srovnání s použitím laboratorních hlodavců z etických důvodů omezené (problém s opakovanými sběry histologických vzorků, dlouhodobým vystavováním nízkým teplotám, genetickou variabilitou atd.). Jednotlivé studie se přitom liší detaily použitého protokolu: délkou experimentu (10 dní – 4 měsíce), různými teplotami (14 °C – 27 °C), atd. Již po 10 dnech vystavování chladu dochází u zkoumaných subjektů ke zvýšené absorpci glukózy do BAT, ale aktivita BAT zůstává velmi nízká (Hanssen et al., 2015). V této studii trávily subjekty každý měsíc v jiné teplotě okolí (24 °C, 19 °C, znovu 24 °C, 27 °C). Po měsíčním pobývání přes noc v 19 °C se signifikantně zvětšuje jak objem, tak aktivita BAT. Po konzumaci jídla se spolu s úrovní energetického metabolismu zvyšuje také citlivost k inzulínu. S přibližováním teplot k termoneutralní zóně subjektů se aktivita a objem BAT snižují až téměř zaniknou (Lee et al., 2014). Přítomnost a aktivita BAT se neliší mezi ženami a muži, a to bez ohledu na expozici chladu (van der Lans et al., 2013). Při opakovaném vystavování chladu (na 2 hodiny denně po dobu 1 měsíce) se celkový oxidační metabolismus BAT zvedl dvojnásobně a aktivita BAT se zvýšila o 45 % (Blondin et al., 2014; Lichtenbelt et al., 2014). Měření PET/CT byla skupina dobrovolníků dle množství přijímaného FDG v tukové tkáni rozdělena na BAT-positivní (s jasně identifikovatelnou BAT) a BAT-negativní (bez BAT). Při měření nepřímé kalorimetrie se ukázalo, že u BAT-positivního člověka aklimatizovaného na 24 °C se při přechodu do místnosti s teplotou o 5 °C nižší zvýší energetický výdej o 28 %, zatímco u BAT-negativního pouze o 3 % (Yoneshiro et al., 2013). Aktivace BAT studenou expozicí se liší v závislosti na věku, mj. kvůli zvýšené akumulaci WAT s přibývajícím věkem. 50 % dvacetiletých vykazuje přítomnost BAT, zatímco u padesátiletých se jedná pouze o 10 % (Yoneshiro et al., 2012).

Aktivita BAT je významnou měrou nepřímo korelována s mírou adipozity u lidí i laboratorních zvířat. Postupné snižování teploty, prodloužení doby pobytu v chladu či podávání agonisty β_3 -adrenergního receptoru vede k nárůstu aktivity BAT, k hnědnutí WAT a zároveň k úbytku množství tělesného tuku. Tyto korelace naznačují, že by aktivita BAT mohla hrát roli v regulaci adipozity a přispívat k prevenci rozvoje obezity.

4. Alternativní mechanismy netřesové termogeneze

4.1. Jak prokázat existenci alternativních mechanismů

Vedle třesu a netřesové termogeneze závislé na UCP1 byly navrženy četné alternativní mechanismy netřesové termogeneze. Zatímco aktivita UCP1 přímo brání vzniku ATP, tyto alternativní mechanismy většinou představují procesy ATP ve velké míře spotřebovávající a tedy uvolňující teplo takto druhotně. Hypotézy o roli těchto mechanismů v adaptivní termogenezi často vychází z nepřímých důkazů a teprve postupně a se značným zpožděním se více či méně úspěšně daří prokazovat jejich reálný příspěvek k termogenezi.

Jelikož se BAT vyskytuje pouze u savců, je zřejmé, že ostatní homoiotermní organismy využívají pro udržení teploty jiné mechanismy (v rozhodující míře patrně svalový třes). K prokázání termogenní funkce daného mechanismu je nutné demonstrovat, že onen mechanismus významně přispívá k termogenezi, tedy je např. schopen nahradit funkci UCP1 nebo třesu. Funkce UCP1 je vyloučena např. u $Ucp1^{-/-}$ myši, které se v chladu spoléhají zvýšenu měrou na třes (viz kapitola 2.4.). V případě existence alternativních mechanismů adaptivní termogeneze by měla míra třesu postupně klesat s tím, jak dochází ke stimulaci příslušného mechanismu (např. navýšení exprese sarkolipinu ve svalu – viz kapitola 4.3.). $Ucp1^{-/-}$ myši, které jsou adaptovány na středně nízkou teplotu (při 18 °C) přežijí v chladu po delší dobu bez známek hypotermie, na rozdíl od myši se stejným genotypem, které jsou adaptovány na svou termoneutrální teplotu (Keipert et al., 2017). Může jít o vliv zvýšené odolnosti trénovaných svalů k únavě, ale uvažuje se i o dalších mechanismech.

Pro vyloučení, že se myši s chybějícím UCP1 zahřívají třesem, je nutno změřit aktivitu jejich svalů. Toto měření se provádí pro kontrolu, zda se $Ucp1^{-/-}$ myš třese stejnou měrou jako $Ucp1^{+/+}$. Na to existuje řada přístupů – vizuální kontrola pomocí videokamery (Feketa et al., 2013), posun složení svalových vláken (Blondin et al., 2017) či elektrická aktivita svalu (EMG viz 3.4). EMG se ukázala jako jediná dostatečně spolehlivá metoda pro kontrolu třesu, ale její provedení je náročné a z toho důvodu se tak často nevyužívá. Jedna z mála prací, která metodu EMG využívá je Golozoubova et al., (2001), která uzavírá, že veškerou práci při vyřazení UCP1, kterou tělo dělá pro zahřátí, je třes (viz výše). V naší laboratoři se provádělo měření EMG u myši kmenů A/J (kmen myši rezistentních k rozvoji obezity, údajně díky vyšší stimulovatelnosti UCP1) a C57Bl/6 (kmen náchylný k rozvoji obezity), které byly z 30 °C přesunuty do 4 °C a průběžně byla měřena jejich teplota těla. Myši obou kmenů krmené stravou s nízkým obsahem tuku však vykazovaly podobnou aktivaci třesu, a tudíž předpokládáme, že se tyto kmeny liší v nějakém termogenním mechanismu jiném než třes (Kus et al., 2008).

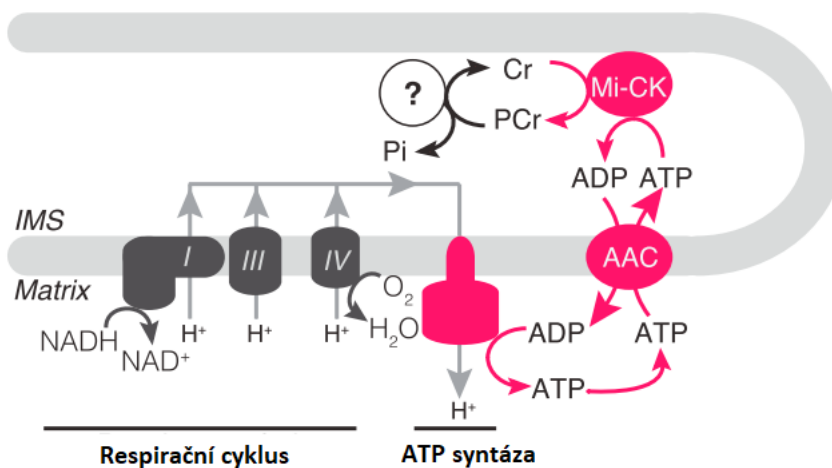
Ve snaze prokázat, že myš s absencí UCP1 dokáže udržet svou tělesnou teplotu bez potřeby třesu, se myším také aplikovala nízká dávka šípového jedu kurare, který ochromuje nervosvalový přenos – a tím dochází k dočasnému ochrnutí kosterního svalu. Po umístění do chladu se Ucp1^{+/-} myši s kurare třásly o 50 % méně než myši Ucp1^{+/-} bez kurare, ale i přes to dokázaly udržet svou tělesnou teplotu téměř v normě, což naznačuje, že netřesové mechanismy jsou dostatečné i při absenci třesu (Maurya et al., 2013; Bal et al., 2012). Existují však pochybnosti, že kurare v tomto případě skutečně bránilo třesu – myši totiž nepotřebovaly žádný podpůrný přístroj na pomoc s dýcháním, takže nedošlo ke kompletní paralýze svalů (Campbell & Dicke, 2018).

Obtížnost technik vedoucích ke kvantifikaci nebo blokaci účinků svalového třesu významně komplikuje výzkum alternativních termogenních mechanismů. V následujících kapitolách se budeme postupně věnovat hlavním alternativním mechanismům, pro které byly zatím nashromážděny alespoň nepřímé důkazy.

4.2. Kreatin

Jedním z alternativních mechanismů netřesové termogeneze je hydrolyza kreatinfosfátu, resp. cyklování kreatinu v běžové tukové tkáni (a možná i v BAT). Kreatin je dusíkatá sloučenina, která je syntetizována v játrech, ledvinách a pankreatu. Největší část kreatinu je transportována krevním oběhem do svalů, především kosterních, kde pomáhá uvolňovat energii v prvotních okamžicích svalové kontrakce. Ve svalových buňkách se vyskytuje pouze relativně malé množství ATP, které při intenzivnější svalové práci vydrží pouze po krátkou dobu (cca 3 vteřiny). Z tohoto důvodu má sval několik mechanismů, kterými lze ATP regenerovat, aby se zajistila trvalá kontrakce. Hlavním z těchto mechanismů je právě využití kreatinfosfátu. V klidovém stavu ATP přenáší svou energii na kreatin za vzniku kreatinfosfátu a ADP. Při svalové kontrakci se kreatinfosfát a ADP mění zpět na ATP a kreatin, čímž je zajištěna energie až na 15 vteřin. Poté je třeba ATP doplňovat jinými cestami (glykolýza, oxidativní fosforylace) (Sahlin et al., 1979).

Hypotetický mechanismus, který by mohl fungovat v běžové tukové tkáni, ten svalový v mnohém připomíná: Mitochondriální kreatin kináza (*mitochondrial creatine kinase* – Mi-CK) spouští fosforylaci kreatinu s využitím fosfátu z mitochondriálního ATP za vzniku fosfokreatinu a uvolnění ADP. Tento fosfokreatin je poté snad hydrolyzován neznámou fosfatázou za vzniku kreatinu a anorganického fosfátu (oproti svalu tedy nedochází k recyklaci ATP, ale k uvolnění tepla) (Kazak et al., 2015). Skutečnost, že hypotetická fosfatáza nebyla dosud identifikována, je významnou slabinou celé hypotézy (Rahbani et al., 2021) (Obr. 5).



Obrázek č. 5: Model kreatinového cyklu. V termogenní tukové tkáni kreatin uvolňuje molární nadbytek mitochondriálního ADP k řízení termogenního dýchání. Takto poháněná respirace vyžaduje přenos ATP z matrix skrz přenašeč ADP a ATP (ACC - ADP/ATP carrier) po přidání exogenního ADP – tento cyklus závisí na aktivitě ATP syntázy, IMS = intermembránový prostor (intermembrane space), Cr = kreatin, PCr = fosfokreatin, Mi-CK = mitochondriální kreatin kináza, AAC = přenašeč ADP/ATP. Upraveno podle (Kazak et al., 2015)

Jak již bylo výše zmíněno (viz kapitola 3.2.), brite adipocyty se vyznačují specifickou morfologií a expresí Ucp1. Byly však identifikovány i morfologicky běžové adipocyty s vysokou mírou biogeneze mitochondrií, avšak bez exprese Ucp1. Kreatinový cyklus však údajně v těchto buňkách probíhá bez ohledu na UCP1 (disipační potenciál UCP1 do jisté míry nahrazuje) (Bertholet et al., 2017). Hydrolyza ATP pohánějící „prázdný“ kreatinový cyklus by pak byla univerzálnější vlastností brite adipocytů, než samotná exprese Ucp1 (Kazak et al., 2015). V UCP1-positivních běžových adipocytech probíhá jak „prázdné“ cyklování kreatinu, tak i klasická termogeneze spojená s UCP1 (Bertholet et al., 2017).

Pro potvrzení, že kreatin hraje roli v netřesové termogenezi, byla farmakologická blokáda kreatinového cyklu pomocí kyseliny β -guanidinopropionové (β -GPA) kombinována s ablací UCP1 a chladovou expozicí. Aplikace β -GPA zvyšovala chladem indukovaný třes (měřený pomocí EMG) podobnou měrou jako ablace UCP1. Zatímco Ucp1^{-/-} zvířata vzdorovala chladu podobně úspěšně jako zvířata se zablokovaným kreatinovým cyklem, kombinace ablace UCP1 a aplikace β -GPA vedla v chladu k hypotermii. Zdá se tedy, že UCP1 a cyklování kreatinu jsou do jisté míry vzájemně zastupitelné (Kazak et al., 2015). Přesto se objevuje i kritika popisovaného experimentu. β -GPA zjevně ovlivňuje hospodaření s kreatinem i v jiných orgánech, než v běžové tukové tkáni – zejména ve svalu, který pak nemusí být schopen efektivního třesu. To by pak mohlo vysvětlovat, proč Ucp1^{-/-} zvířata upadala po aplikaci β -GPA do hypotermie, místo aby zapojila třes, jak by se patrně čekalo na základě dřívějších výsledků (Golozoubova et al., 2001).

„Prázdné“ cyklování kreatinu hraje zásadní roli v metabolismu tukové tkáně, kdy se při stimulaci ATP zvyšuje energetický výdej živočicha (Kazak et al., 2019). Objevil se názor, že by „prázdné“ cyklování kreatinu mohlo být užitečné pro redukci viscerálního tuku v místech, kde je nízká exprese Ucp1 (Bertholet et al., 2017). Při blokaci transportu kreatinu přes mitochondriální membránu dochází ke snížení energetického výdeje beze změny v příjmu potravy, a to vede k rozvoji obezity. Tomu by nasvědčovaly výsledky s podáváním kreatinu myším na kontrolní stravě a HFD. Při podávání přídatku kreatinu a CL 316,243 se při normální stravě energetický výdej těchto myší nezměnil, ale po akutním krmení HFD se navýšil. Z toho vyplývá, že transport kreatinu je důležitý pro termogenezi vyvolávanou stravou (Kazak et al., 2019). Tato pozorování myšního modelu se však nepodařilo prokázat u lidí. U vegetariánů, kteří mají obecně výrazně snížené zásoby kreatinu v těle, neměla suplementace kreatinu žádný vliv na termogenezi a aktivaci BAT po vystavení chladu (Connell et al., 2021). Význam kreatinového cyklu u člověka tak zůstává otázkou.

4.3. Sarkolipin

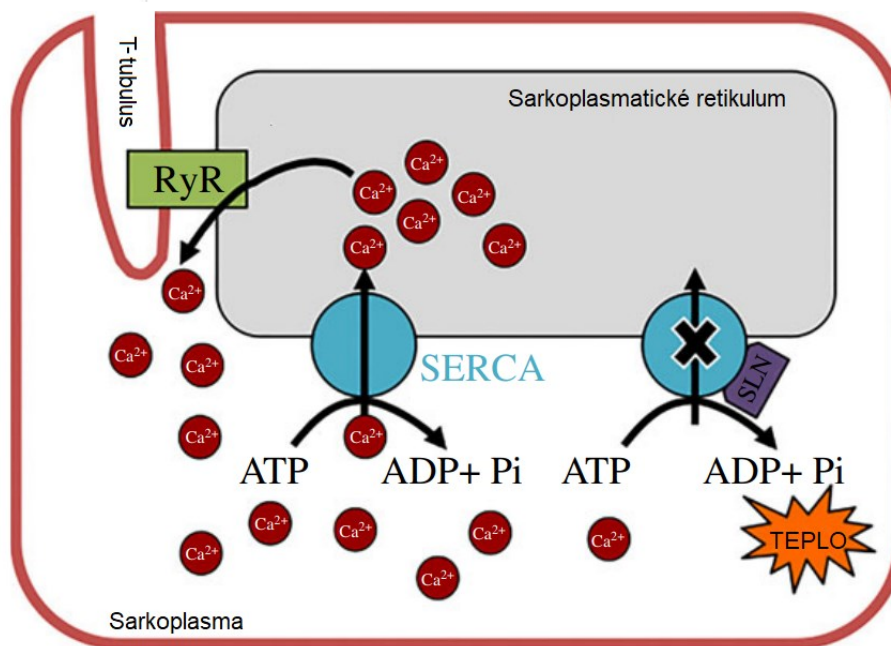
Dalším potenciálním mechanismem je odpřažení vápenaté pumpy SERCA ve svalu působením sarkolipinu. Sarkolipin by mohl umožňovat velký obrat spotřeby ATP navázaný přímo na svalovou práci, neboť odpřahuje hydrolyzu ATP od pumpování Ca^{2+} .

Shromažďování vápníku a jeho kontrolované vypouštění např. při svalové kontrakci zajišťuje ve svalových buňkách sarkoplasmatické retikulum. Kanály, které uvolňují vápník ze sarkoplasmatického retikula jsou receptory inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3R) a ryanodinové receptory (RyR). Relaxaci svalů zajišťuje SERCA pumpa, která transportuje 2 ionty vápníku z cytosolu do sarkoplasmatického retikula vláken kosterní a srdeční svalové tkáně za spotřeby ATP (viz výše v kapitole 1.) (Yu et al., 1993). SERCA se vyskytuje ve dvou konformacích: E1, to je stav, kdy má vysokou afinitu k Ca^{2+} a E2 s nízkou afinitou k Ca^{2+} (Haviv & Karlsh, 2013).

Aktivita SERCA je v buňce kontrolována a inhibována proteiny sarkolipin (**SLN**) a fosfolamban (**PLB**). PLB se vyskytuje v sarkoplasmatickém retikulu srdce, kde interaguje se SERCA2a, čímž snižuje afinitu PLB-SERCA komplexu k Ca^{2+} (Luo et al., 1994; Sahoo et al., 2013). Při chladové expozici mohly myši, kterým chyběl PLB, udržet svou tělesnou teplotu v normě, což naznačovalo, že PLB nemá vliv na termogenezi (Sahoo et al., 2013). Protein SLN se nachází v sarkoplasmatickém retikulu kosterního svalů a při termogenezi plní důležitou funkci (Babu et al., 2007). Při chladové expozici u myší s chybějícím SLN dochází k hypotermii (Sahoo et al., 2013).

SLN se může vázat na SERCA i při vysoké koncentraci Ca^{2+} (E1 stav SERCA pumpy) a zůstává navázan po celou dobu katalytického cyklu. Jeho přítomnost významně snižuje

rychlost absorpce vápníku do sarkoplasmatického retikula, zatímco hydrolyza ATP zůstává neměnná včetně její rychlosti. Při vazbě SLN na SERCA pumpu tedy dochází k odprážení transportu Ca^{2+} od hydrolyzy ATP a dochází k „prázdnému“ cyklování SERCA a k produkci tepla (Mall et al., 2008) (viz obr. 6). C-konec SLN je důležitý pro lokalizaci SERCA a následné interakce (Odermatt et al., 1998). N-konec má důležitou roli v odpráhování – při jeho delecii dokáže SLN najít SERCA pumpu, ale ztrácí svou funkci – odpráhování (Sahoo et al., 2015).



Obrázek č. 6: Model „prázdného“ cyklování SERCA pumpy v přítomnosti sarkolipinu. SERCA po navázání sarkolipinu rozkládá ATP na ADP a fosfát bez pumpování vápenatých iontů do sarkoplasmatického retikula a dochází tak k uvolňování tepla. SLN = sarkolipin, RyR = Ryanodinové receptory. Upraveno podle (Stager & Cheviron, 2020).

Jednotlivé studie se ve většině případů shodují, že SLN snižuje afinitu SERCA k vápenatým iontům, ale rozchází se v tom, jak ovlivňuje (zvyšuje či snižuje) maximální rychlost vychytávání Ca^{2+} . Při odstranění SLN dochází v srdečních síních ke zvýšené maximální rychlosti vychytávání Ca^{2+} , ale v komorách ne, což může být způsobeno odlišnou expresí sarkolipinu v různých částech srdce (Babu et al., 2007). Podle jedné studie dochází u myši s chybějícím SLN ke zvýšení aktivity SERCA v kosterních svalech, které v normálním stavu exprimují vysoké hladiny SLN (např. v lýtkovém svalu), což je interpretováno jako doklad, že SLN snižuje aktivitu SERCA (Tupling et al., 2011; Buffy et al., 2006). Další studie dokládá, že SLN snižuje maximální rychlost vychytávání Ca^{2+} až o 33 % (Sahoo et al., 2013). Bylo prokázáno, že vlivem SLN dochází u krysa ke snížení účinku na afinitu SERCA k Ca^{2+} v lýtkovém svalu, a potvrzeno, že je inhibítoem SERCA funkce (Tupling et al., 2002). Bylo také publikováno, že SLN nemá žádný významný účinek na afinitu SERCA pumpy k Ca^{2+} (Smith et al., 2002). Tato rozdílná data mohou být způsobena nekompatibilitou použitých

testů na měření hydrolýzy ATP či použití různých sekvencí Sln (Campbell & Dicke, 2018). Např. Buffy et al., (2006) staví svá měření na magnetické rezonanci, zatímco Sahoo et al., (2013) používá metodu BIOMOL. Tupling et al., (2011) využívá SLN značeného N-terminálně FLAG epitopem, Smith et al., (2002) pozoruje syntetické SLN z králíčího kosterního svalu.

Sarkolipin může také hrát roli ve zprostředkování DEE, neboť $Sln^{-/-}$ myši (podobně jako $Ucp1^{-/-}$ myši – viz kapitola 3.5.) přibírají na HFD více než kontrolní $Sln^{+/+}$ zvířata (Bal et al., 2012). Tým dr. Bala se dále pokusil podložit roli SLN v adaptivní termogenezi prováděním zátěžových testů na $Sln^{-/-}$ myších. Při akutní chladové expozici (4 °C) aktivita BAT plně překryla možný efekt chybějícího SLN. Proto byla iBAT v dalších experimentech myším chirurgicky odstraněna. Myši, kterým byl odstraněn SLN i BAT, nepřežily, zatímco myši, kterým chyběl pouze SLN, dokázaly udržet stárou, byť sníženou teplotu těla stejně jako myši, kterým chyběl pouze BAT. Tyto výsledky tedy naznačují, že SLN a BAT se mohou navzájem nahrazovat (Bal et al., 2012). Míra třesové termogeneze však byla v tomto experimentu vyhodnocována pouze pomocí kamerového záznamu, což není zcela uspokojivý způsob.

iBAT je největším, avšak nikoli jediným tukovým depem obsahujícím UCP1 (viz kapitola 3.1.). Experiment s chirurgickým odstraněním tohoto depa proto elegantně doplňuje pozdější práce kombinující celotělovou genetickou ablací UCP1 s ablací SLN (tzv. *double knock-out* myš – dKO). Tato zvířata, tentokrát krměná stravou s klasickým obsahem tuku, se v principu chovala podobně jako $Sln^{-/-}$ s odstraněnou iBAT v publikaci diskutované výše, UCP1 a SLN se opět vzájemně alternovaly. U $Ucp1^{-/-}$ myší dochází po vystavení chladu k nárůstu obsahu myoglobinu a SLN v kosterním svalu. U $Sln^{-/-}$ myší se pro změnu dvakrát zvýšila hladina UCP1 oproti $Sln^{+/+}$ a docházelo k hnědnutí WAT. dKO zvířata byla poněkud překvapivě schopna přežít i chladovou expozici (evidentně s pomocí svalového třesu, který však nebyl kvantifikován). Toto přežívání však bylo pouze za cenu téměř úplného vyčerpání zásobních lipidů ve WAT (Rowland et al., 2015).

Přestože bylo potvrzeno, že SLN ovlivňuje funkci SERCA pumpy, stále není jasné, kolik tepla se pomocí „prázdného“ cyklování vyprodukuje a o kolik se to liší oproti klasické netřesové termogenezi. Další dosud nezodpovězenou otázkou zůstává, jakým způsobem se zapíná/vypíná SLN-SERCA pumpa nezávisle na kontrakci svalu (Campbell & Dicke, 2018). Není jasný ani molekulární mechanismus odpojení transportu Ca^{2+} od hydrolýzy ATP v SERCA. Může jít o sklouznutí iontů Ca^{2+} vázaných na SERCA do cytosolu po hydrolýze ATP (Mall et al., 2008), nebo o pasivní únik Ca^{2+} z lumenu zpět do cytosolu prostřednictvím SERCA (Campbell & Dicke, 2018).

4.4. „Prázdné“ TAG/MK cyklování

Třetím významným energeticky náročným pochodem spotřebovávajícím velké množství ATP a potenciálně tím přispívajícím k adaptivní termogenezi by mohla být syntéza a opětovné odbourávání zásobních lipidů v tukové tkáni (tedy prázdné cyklování lipolýzy TAG a zpětná re-esterifikace MK). Podobnou funkci by mohla plnit syntéza a následná oxidace MK (de novo lipogeneze a β -oxidace) (Yu et al., 2002).

Ve WAT (a v menší míře v BAT) jsou ukládány MK ve formě TAG. Během hladovění se energetické substráty pro jednotlivé orgány získávají hydrolýzou TAG na MK a glycerol. Tento proces se nazývá lipolýza a je katalyzována lipázami, jako je HSL, spouštěná adrenergní stimulací. Dalším významným enzymem je tuková triglyceridová lipáza (*adipose triglyceride lipase* – **ATGL**), jež katalyzuje počáteční krok hydrolýzy TAG (Zimmermann et al., 2004). Činností lipáz jsou TAG štěpeny na MK a glycerol. MK jsou vyplaveny do oběhu a slouží jako energetický substrát pro velké množství dalších tkání (např. BAT), glycerol je pak možné použít v játrech k syntéze glukózy. Část lipolyzovaných MK je ovšem možné také zpětně reesterifikovat do podoby TAG (dochází tak k „prázdnému“ cyklování TAG/MK) (Kalhan et al., 2001). Pro uskutečnění tohoto cyklu je třeba velké množství energie. K syntéze TAG je totiž MK nejprve nutné aktivovat vazbou na koenzym A (enzymem acyl-CoA syntetázou, **ACSL**), přičemž dochází k hydrolýze ATP. Aktivované MK jsou pak konjugovány s glycerol-fosfátem. Glycerol-fosfát může být vytvořen z glycerolu pomocí glycerol-kinázy. Expresie glycerol-kinázy ve WAT je však velice nízká, takže většina potřebného glycerol-fosfátu musí být získávána z glukózy a podobných substrátů (Rotondo et al., 2017).

Lipolýza jedné molekuly TAG a kompletní re-esterifikace uvolněných MK stojí 8 molekul ATP, tedy poměrně velké množství energie (Baldwin, 1970). Před objevem UCP1 byly proto lipolýza a oxidace mastných kyselin považovány za hlavní zdroj tepla v BAT.

Syntéza a oxidace MK jsou v adipocytech spouštěny adrenergní stimulací. Jedním ze způsobů, jak lze aktivovat β_3 -adrenergní receptory je opakovaným podáváním CL 316,243. Po sedmidenní adrenergní stimulaci se množství TAG sníží v epididymální WAT (oblast WAT s minimální expresí Ucp1), zatímco v interskapulární bílé tukové tkáni či BAT se nemění. Ve všech tukových depech je množství TAG dlouhodobě v zásadě konstantní, neboť při chronickém podávání CL je lipolýza kompenzována zvýšenou syntézou MK a TAG. Po 7 dnech se ve všech tukových oblastech zvýšil lipidový obrat, který vyžaduje aktivitu ATGL (Mottillo et al., 2014).

Přirozenější cestou adrenergní stimulace tukové tkáně je vystavování zvířete chladu. Tento druh experimentů je prováděn také v naší laboratoři, kde často srovnáváme situaci u myšího kmene C57Bl/6 náchylného k obezitě se situací u kmene A/J k obezitě rezistentního (viz výše). Po dvoudenním otužování se hladiny neesterifikovaných MK a TAG v cirkulaci přechodně snížily, při pokračující chladové expozici však byly postupně normalizovány. Pro pochopení metabolismu WAT se pomocí deuteria (^2H) měřila rychlost syntézy TAG a *de novo* lipogeneze ve WAT. Rychlost syntézy TAG byla přitom u obou kmenů řádově vyšší než syntéza MK. Hlavním zjištěním byla skutečnost, že s chladem se syntéza TAG v gonadální WAT zvyšuje výrazně více u A/J než u C57Bl/6 kmene a míra cyklování TAG/MK by tak mohla souviset s rezistencí A/J myší k obezitě. Je spíše nepravděpodobné, že by byla míra obratu TAG/MK ve WAT u chladově exponovaných myší dostatečná k tomu, aby takto uvolněná energie významnější měrou přispívala k adaptivní termogenezi. Zdá se však, že flexibilní regulace TAG/MK metabolismu ve WAT úzce souvisí se zachováním celkové metabolické flexibility a pomáhá předcházet rozvoji zdravotních komplikací spojených s obezitou (Flachs et al., 2017).

5. Závěr

Termogeneze je určena k zahřívání organismu pomocí mimovolných svalových záškubů a méně energeticky náročné netřesové termogeneze. U savců je netřesová termogeneze tradičně spojována s BAT a jejím unikátním proteinem UCP1, který odpřahuje buněčnou respiraci od produkce ATP. Při aktivaci kanálu UCP1 jím prochází protony do matrix mitochondrie, čímž dochází ke konverzi chemické energie na tepelnou (produkce tepla). Tímto způsobem si mohou savci udržovat stálou tělesnou teplotu. Molekuly UCP1 byly také izolovány z tzv. běžových adipocytů, které se při dlouhodobé expozici chladu či stimulaci β_3 -adrenergeních receptorů objevují ve WAT.

UCP1 je členem rodiny odpřahujících proteinů, která se skládá ze 6 členů, jmenovitě: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, UCP6. Ačkoliv role UCP1 je v netřesové termogenezi jednoznačná, o roli ostatních UCP v adaptivní termogenezi se dnes již prakticky neuvažuje.

Některé vědecké skupiny navrhly mechanismy, které by mohly přispívat k netřesové termogenezi v dalších tkáních. Jedním z mechanismů je odpřahování SERCA pumpy od transportu vápenatých iontů do sarkoplasmatického retikula pomocí sarkolipinu. Po navázání tohoto proteinu na SERCA pumpu se snižuje množství transportovaných vápenatých iontů, ačkoliv rychlost hydrolýzy ATP se nemění, čímž dochází k „prázdnému“ cyklování SERCA a produkci tepla. Cyklování kreatinu je dalším navrhovaným mechanismem probíhajícím v běžové tukové tkáni. Toto cyklování kreatinu a fosfokreatinu, jež má spotřebovat významné množství ATP závisí na aktivitě Mi-CK a aktivitě dosud neidentifikované fosfatázy. Posledním mechanismem je lipolýza TAG a zpětná re-esterifikace MK do podoby TAG. Všechny tyto navrhované procesy jsou bezpochyby vysoce energeticky náročné. O fungování těchto mechanismů jako zásadních termogenních činitelů však dosud neexistují dostatečné důkazy.

6. Použitá literatura

- Alvarez-Crespo, M., Csikasz, R. I., Martínez-Sánchez, N., Diéguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., & López, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Molecular Metabolism*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.008>
- Ameka, M., Markan, K. R., Morgan, D. A., BonDurant, L. D., Idiga, S. O., Naber, M. C., Zhu, Z., Zingman, L. v., Grobe, J. L., Rahmouni, K., & Potthoff, M. J. (2019). Liver Derived FGF21 Maintains Core Body Temperature During Acute Cold Exposure. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37198-y>
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., & Ricquier, D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics*, 26(4). <https://doi.org/10.1038/82565>
- Aydin, J., Shabalina, I. G., Place, N., Reiken, S., Zhang, S., Bellinger, A. M., Nedergaard, J., Cannon, B., Marks, A. R., Bruton, J. D., & Westerblad, H. (2008). Nonshivering thermogenesis protects against defective calcium handling in muscle. *The FASEB Journal*, 22(11). <https://doi.org/10.1096/fj.08-113712>
- Babu, G. J., Bhupathy, P., Timofeyev, V., Petrashevskaya, N. N., Reiser, P. J., Chiamvimonvat, N., & Periasamy, M. (2007). Ablation of sarcolipin enhances sarcoplasmic reticulum calcium transport and atrial contractility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45). <https://doi.org/10.1073/pnas.0707722104>
- Bal, N. C., Maurya, S. K., Sopariwala, D. H., Sahoo, S. K., Gupta, S. C., Shaikh, S. A., Pant, M., Rowland, L. A., Goonasekera, S. A., Molkentin, J. D., & Periasamy, M. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nature Medicine*, 18(10). <https://doi.org/10.1038/nm.2897>
- Baldwin, R. L. (1970). Metabolic functions affecting the contribution of adipose tissue to total energy expenditure. In *Federation Proceedings*. Federation of American Societies for Experimental Biology (Vol. 29, pp. 1277-1283).
- Becker, A. S., Nagel, H. W., Wolfrum, C., & Burger, I. A. (2016). Anatomical grading for metabolic activity of brown adipose tissue. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149458>
- Bertholet, A. M., Kazak, L., Chouchani, E. T., Bogaczyńska, M. G., Paranjpe, I., Wainwright, G. L., Bétourné, A., Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Kirichok, Y. (2017). Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell Metabolism*, 25(4). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.002>
- Blondin, D. P., Daoud, A., Taylor, T., Tingelstad, H. C., Bézaire, V., Richard, D., Carpentier, A. C., Taylor, A. W., Harper, M. E., Aguer, C., & Haman, F. (2017). Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *Journal of Physiology*, 595(6). <https://doi.org/10.1113/JP273395>
- Blondin, D. P., Labbé, S. M., Tingelstad, H. C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, É. E., Carpentier, A. C., Richard, D., & Haman, F. (2014). Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(3). <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3901>
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., & Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Letters*, 408(1). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00384-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00384-0)
- Buffy, J. J., Buck-Koehntop, B. A., Porcelli, F., Traaseth, N. J., Thomas, D. D., & Veglia, G. (2006). Defining the Intramembrane Binding Mechanism of Sarcolipin to Calcium ATPase Using

- Solution NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 358(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.005>
- Campbell, K. L., & Dicke, A. A. (2018). Sarcolipin makes heat, but is it adaptive thermogenesis? In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00714> **REVIEW**
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology*, 214(2). <https://doi.org/10.1242/jeb.050989> **REVIEW**
- Caron, A., Labbé, S. M., Carter, S., Roy, M. C., Lecomte, R., Ricquier, D., Picard, F., & Richard, D. (2017). Loss of UCP2 impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue. *Biochimie*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.006>
- Chaplin, G., Jablonski, N. G., Sussman, R. W., & Kelley, E. A. (2014). The role of piloerection in primate thermoregulation. *Folia Primatologica*, 85(1). <https://doi.org/10.1159/000355007>
- Chondronikola, M., Annamalai, P., Chao, T., Porter, C., Saraf, M. K., Cesani, F., & Sidossis, L. S. (2015). A percutaneous needle biopsy technique for sampling the supraclavicular brown adipose tissue depot of humans. *International Journal of Obesity*, 39(10). <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.76>
- Cline, G. W., Vidal-Puig, A. J., Dufour, S., Cadman, K. S., Lowell, B. B., & Shulman, G. I. (2001). In Vivo Effects of Uncoupling Protein-3 Gene Disruption on Mitochondrial Energy Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23). <https://doi.org/10.1074/jbc.M102540200>
- Coelho, A., Antunes-Lopes, T., Gillespie, J., & Cruz, F. (2017). Beta-3 adrenergic receptor is expressed in acetylcholine-containing nerve fibers of the human urinary bladder: An immunohistochemical study. *Neurourology and Urodynamics*, 36(8). <https://doi.org/10.1002/nau.23224>
- Connell, N. J., Doligkeit, D., Andriessen, C., Kornips-Moonen, E., Bruls, Y. M. H., Schrauwen-Hinderling, V. B., van de Weijer, T., van Marken-Lichtenbelt, W. D., Havekes, B., Kazak, L., Spiegelman, B. M., Hoeks, J., & Schrauwen, P. (2021). No evidence for brown adipose tissue activation after creatine supplementation in adult vegetarians. *Nature Metabolism*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00332-0>
- Crandall, J. P., Joo, H. O., Gajwani, P., Leal, J. P., Mawhinney, D. D., Sterzer, F., & Wahl, R. L. (2018). Measurement of brown adipose tissue activity using microwave radiometry and 18F-FDG PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(8). <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.204339>
- Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Elía, E. F., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., & Kolodny, G. M. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a β_3 -adrenergic receptor agonist. *Cell Metabolism*, 21(1). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009>
- Douglas, I. J., Langham, J., Bhaskaran, K., Brauer, R., & Smeeth, L. (2013). Orlistat and the risk of acute liver injury: Self controlled case series study in UK Clinical Practice Research Datalink. *BMJ (Online)*, 346(7906). <https://doi.org/10.1136/bmj.f1936>
- Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E., & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 387(6628). <https://doi.org/10.1038/387090a0>
- Feketa, V. v., Balasubramanian, A., Flores, C. M., Player, M. R., & Marrelli, S. P. (2013). Shivering and tachycardic responses to external cooling in mice are substantially suppressed by TRPV1 activation but not by TRPM8 inhibition. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 305(9). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00296.2013>

- Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009). UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism*, 9(2). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.014>
- Fischer, A. W., Csikasz, R. I., von Essen, G., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2016). No insulating effect of obesity. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 311(1). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2016>
- Flachs, P., Adamcova, K., Zouhar, P., Marques, C., Janovska, P., Viegas, I., Jones, J. G., Bardova, K., Svobodova, M., Hansikova, J., Kuda, O., Rossmeisl, M., Liisberg, U., Borkowska, A. G., Kristiansen, K., Madsen, L., & Kopecky, J. (2017). Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: Link to lean phenotype. *International Journal of Obesity*, 41(3). <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.228>
- Flery, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., & Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics*, 15(3). <https://doi.org/10.1038/ng0397-269>
- Gao, F., Zheng, K. I., Wang, X. B., Sun, Q. F., Pan, K. H., Wang, T. Y., Chen, Y. P., Targher, G., Byrne, C. D., George, J., & Zheng, M. H. (2020). Obesity Is a Risk Factor for Greater COVID-19 Severity. In *Diabetes Care* (Vol. 43, Issue 7). <https://doi.org/10.2337/dc20-0682>
- Gaudry, M. J., Jastroch, M., Treberg, J. R., Hofreiter, M., Pajmans, J. L. A., Starrett, J., Wales, N., Signore, A. v., Springer, M. S., & Campbell, K. L. (2017). Inactivation of thermogenic UCP1 as a historical contingency in multiple placental mammal clades. *Science Advances*, 3(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602878>
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *The FASEB Journal*, 15(11). <https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje>
- Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilo, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou, C. J., Everett, C., Kozak, L. P., Li, C., Deng, C., Harper, M. E., & Reitman, M. L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21). <https://doi.org/10.1074/jbc.M910177199>
- Gorgoglione, R., Porcelli, V., Santoro, A., Daddabbo, L., Voza, A., Monné, M., di Noia, M. A., Palmieri, L., Fiermonte, G., & Palmieri, F. (2019). The human uncoupling proteins 5 and 6 (UCP5/SLC25A14 and UCP6/SLC25A30) transport sulfur oxyanions, phosphate and dicarboxylates. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1860(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.07.010>
- Granneman, J. G., Burnazi, M., Zhu, Z., & Schwamb, L. A. (2003). White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 285(6 48-6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00197.2003>
- Grujic, D., Susulic, V. S., Harper, M. E., Himms-Hagen, J., Cunningham, B. A., Corkey, B. E., & Lowell, B. B. (1997). β_3 -adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate β_3 -selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake: A study using transgenic and gene knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17686>
- Haman, F., Péronnet, F., Kenny, G. P., Massicotte, D., Lavoie, C., & Weber, J. M. (2005). Partitioning oxidative fuels during cold exposure in humans: Muscle glycogen becomes dominant as shivering intensifies. *Journal of Physiology*, 566(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086272>
- Hanssen, M. J. W., Hoeks, J., Brans, B., van der Lans, A. A. J. J., Schaart, G., van den Driessche, J. J., Jörgensen, J. A., Boekschoten, M. v., Hesselink, M. K. C., Havekes, B., Kersten, S., Mottaghy, F. M., van Marken Lichtenbelt, W. D., & Schrauwen, P. (2015). Short-term cold

- acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nature Medicine*, 21(8). <https://doi.org/10.1038/nm.3891>
- Haviv, H., & Karlsh, S. J. D. (2013). P-Type Pumps: Na⁺,K⁺-ATPase. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00198-5>
- Hilse, K. E., Kalinovich, A. v., Rupprecht, A., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Staniek, K., Erben, R. G., & Pohl, E. E. (2016). The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1857(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.011>
- Hopkins, M., Duarte, C., Beaulieu, K., Finlayson, G., Gibbons, C., Johnstone, A. M., Whybrow, S., Horgan, G. W., Blundell, J. E., & Stubbs, R. J. (2019). Activity energy expenditure is an independent predictor of energy intake in humans. *International Journal of Obesity*, 43(7). <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0308-6>
- Hou, L., Shi, J., Cao, L., Xu, G., Hu, C., & Wang, C. (2017). Pig has no uncoupling protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.118>
- James, W. P. T., Astrup, A., Finer, N., Hilsted, J., Kopelman, P., Rössner, S., Saris, W. H. M., & van Gaal, L. F. (2000). Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: A randomised trial. *Lancet*, 356(9248 SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03491-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03491-7)
- Jiménez-Jiménez, J., Ledesma, A., Zaragoza, P., González-Barroso, M. M., & Rial, E. (2006). Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1757(9–10). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.027>
- Kalhan, S. C., Mahajan, S., Burkett, E., Reshef, L., & Hanson, R. W. (2001). Glyceroneogenesis and the Source of Glycerol for Hepatic Triacylglycerol Synthesis in Humans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16). <https://doi.org/10.1074/jbc.M006186200>
- Kazak, L., Chouchani, E. T., Jedrychowski, M. P., Erickson, B. K., Shinoda, K., Cohen, P., Vetrivelan, R., Lu, G. Z., Laznik-Bogoslavski, D., Hasenfuss, S. C., Kajimura, S., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2015). A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell*, 163(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035>
- Kazak, L., Rahbani, J. F., Samborska, B., Lu, G. Z., Jedrychowski, M. P., Lajoie, M., Zhang, S., Ramsay, L. A., Dou, F. Y., Tenen, D., Chouchani, E. T., Dzeja, P., Watson, I. R., Tsai, L., Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2019). Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nature Metabolism*, 1(3). <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0035-x>
- Keipert, S., Kutschke, M., Ost, M., Schwarzmayer, T., van Schothorst, E. M., Lamp, D., Brachthäuser, L., Hamp, I., Mazibuko, S. E., Hartwig, S., Lehr, S., Graf, E., Plettenburg, O., Neff, F., Tschöp, M. H., & Jastroch, M. (2017). Long-Term Cold Adaptation Does Not Require FGF21 or UCP1. *Cell Metabolism*, 26(2). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.016>
- Keipert, S., Lutter, D., Schroeder, B. O., Brandt, D., Stählmann, M., Schwarzmayer, T., Graf, E., Fuchs, H., de Angelis, M. H., Tschöp, M. H., Rozman, J., & Jastroch, M. (2020). Endogenous FGF21-signaling controls paradoxical obesity resistance of UCP1-deficient mice. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14069-2>
- Klussmann, F. W., Stelter, W. J., & Spaan, G. (1969, May). Temperature sensitivity of spinal motoneurons of the cat. In *Federation proceedings* (Vol. 28, No. 3, pp. 992-995).
- Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., & Cinti, S. (2018). Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research*, 59(5). <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>

- Kramarova, T. v., Shabalina, I. G., Andersson, U., Westerberg, R., Carlberg, I., Houstek, J., Nedergaard, J., & Cannon, B. (2008). Mitochondrial ATP synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-Fo subunit P1 isoform. *The FASEB Journal*, 22(1). <https://doi.org/10.1096/fj.07-8581com>
- Kus, V., Prazak, T., Brauner, P., Hensler, M., Kuda, O., Flachs, P., Janovska, P., Medrikova, D., Rossmeisl, M., Jilkova, Z., Stefl, B., Pastalkova, E., Drahotka, Z., Houstek, J., & Kopecky, J. (2008). Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: Association with obesity-resistance. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 295(2). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90256.2008>
- Lee, M., Jeon, J. Y., Neugent, M. L., Kim, J. W., & Yun, M. (2017). 18F-Fluorodeoxyglucose uptake on positron emission tomography/computed tomography is associated with metastasis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis*, 34(3–4). <https://doi.org/10.1007/s10585-017-9847-9>
- Lee, P., Smith, S., Linderman, J., Courville, A. B., Brychta, R. J., Dieckmann, W., Werner, C. D., Chen, K. Y., & Celi, F. S. (2014). Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, 63(11). <https://doi.org/10.2337/db14-0513>
- Li, H., Wu, G., Fang, Q., Zhang, M., Hui, X., Sheng, B., Wu, L., Bao, Y., Li, P., Xu, A., & Jia, W. (2018). Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02677-9>
- Li, X., Liu, J., Wang, G., Yu, J., Sheng, Y., Wang, C., Lv, Y., Lv, S., Qi, H., Di, W., Yin, C., & Ding, G. (2015). Determination of UCP1 expression in subcutaneous and perirenal adipose tissues of patients with hypertension. *Endocrine*, 50(2). <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0572-3>
- Lichtenbelt, W. van M., Kingma, B., van der Lans, A., & Schellen, L. (2014). Cold exposure – an approach to increasing energy expenditure in humans. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.01.001>
- Luo, W., Grupp, I. L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J. J., Doetschman, T., & Kranias, E. G. (1994). Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of β -agonist stimulation. *Circulation Research*, 75(3). <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.3.401>
- Mall, S., Broadbridge, R., Harrison, S. L., Gore, M. G., Lee, A. G., & East, J. M. (2006). The presence of sarcolipin results in increased heat production by Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48). <https://doi.org/10.1074/jbc.M606869200>
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., & Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Letters*, 443(3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01713-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01713-X)
- Marinho, T. de S., Ornellas, F., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2020). Browning of the subcutaneous adipocytes in diet-induced obese mouse submitted to intermittent fasting. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 513. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110872>
- Martin, C. K., Redman, L. M., Zhang, J., Sanchez, M., Anderson, C. M., Smith, S. R., & Ravussin, E. (2011). Lorcaserin, a 5-HT2C receptor agonist, reduces body weight by decreasing energy intake without influencing energy expenditure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3). <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1848>
- Masserman, J. H., & Goldsmith, H. (1934). Dinitrophenol: Its therapeutic and toxic actions in certain types of psychobiologic underactivity. *Journal of the American Medical Association*, 102(7). <https://doi.org/10.1001/jama.1934.02750070021006>
- Matoulek, M., Svačina, Š., & Lajka, J. (2010). Výskyt obezity a jejích komplikací v České republice. In *Vnitřní Lekarství* (Vol. 56, Issue 10).

- Maurya, S. K., Periasamy, M., & Bal, N. C. (2013). High gender-specific susceptibility to curare – a neuromuscular blocking agent. In *Biological Research* (Vol. 46, Issue 1). <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000100011>
- McMurray, R. G., Soares, J., Caspersen, C. J., & McCurdy, T. (2014). Examining variations of resting metabolic rate of adults: A public health perspective. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 46(7). <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000232>
- Modrianský, M., Murdza-Inglis, D. L., Patel, H. v., Freeman, K. B., & Garlid, K. D. (1997). Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.24759>
- Morris, E. M., Noland, R. D., Allen, J. A., McCoin, C. S., Xia, Q., Koestler, D. C., Shook, R. P., Lighton, J. R. B., Christianson, J. A., & Thyfault, J. P. (2020). Difference in Housing Temperature-Induced Energy Expenditure Elicits Sex-Specific Diet-Induced Metabolic Adaptations in Mice. *Obesity*, 28(10). <https://doi.org/10.1002/oby.22925>
- Mottillo, E. P., Balasubramanian, P., Lee, Y. H., Weng, C., Kershaw, E. E., & Granneman, J. G. (2014). Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β_3 -adrenergic receptor activation. *Journal of Lipid Research*, 55(11). <https://doi.org/10.1194/jlr.M050005>
- Nakayama, T., Hammel, H. T., Hardy, J. D., & Eisenman, J. S. (1963). Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 204(6). <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1963.204.6.1122>
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2013). UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.009>
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression*, 1492(1). [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00067-1)
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., & MacLennan, D. H. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12360>
- Ouellet, V., Labbé, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E. E., Richard, D., & Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 122(2). <https://doi.org/10.1172/JCI60433>
- Rahbani, J. F., Roesler, A., Hussain, M. F., Samborska, B., Dykstra, C. B., Tsai, L., Jedrychowski, M. P., Vergnes, L., Reue, K., Spiegelman, B. M., & Kazak, L. (2021). Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat. *Nature*, 590(7846).
- Rehmark, S., Bianco, A. C., Kieffer, J. D., & Silva, J. E. (1992). Transcriptional and posttranscriptional mechanisms in uncoupling protein mRNA response to cold. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 262(1 25-1). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.1.e58>
- Riley, C. L., & Mills, E. M. (2020). UCP3 plays a complementary role to UCP1 in brown adipose tissue mitochondrial bioenergetics. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.003442>
- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M. E., MacIntyre, D., Turner, J. O., Moore, J. D., Blackburn, E., Gullick, W. J., Cinti, S., Montana, G., Parker, M. G., & Christian, M. (2014). Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 306(8). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00473.2013>

- Rotondo, F., Ho-Palma, A. C., Remesar, X., Fernández-López, J. A., Romero, M. D. M., & Alemany, M. (2017). Glycerol is synthesized and secreted by adipocytes to dispose of excess glucose, via glycerogenesis and increased acyl-glycerol turnover. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09450-4>
- Rowland, L. A., Bal, N. C., Kozak, L. P., & Periasamy, M. (2015). Uncoupling protein 1 and sarcolipin are required to maintain optimal thermogenesis, and loss of both systems compromises survival of mice under cold stress. *Journal of Biological Chemistry*, 290(19). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637603>
- Sahlin, K., Harris, R. C., & Hultman, E. (1979). Resynthesis of creatine phosphate in human muscle after exercise in relation to intramuscular pH and availability of oxygen. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 39(6). <https://doi.org/10.3109/00365517909108833>
- Sahoo, S. K., Shaikh, S. A., Sopariwala, D. H., Bal, N. C., Bruhn, D. S., Kopec, W., Khandelia, H., & Periasamy, M. (2015). The N terminus of sarcolipin plays an important role in uncoupling sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) ATP hydrolysis from Ca²⁺ transport. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636738>
- Sahoo, S. K., Shaikh, S. A., Sopariwala, D. H., Bal, N. C., & Periasamy, M. (2013). Sarcolipin protein interaction with Sarco(endo)plasmic reticulum CA²⁺-ATPase (SERCA) Is distinct from phospholamban protein, and only sarcolipin can promote uncoupling of the serca pump. *Journal of Biological Chemistry*, 288(10). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436915>
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., Sparks, C. A., Tang, Y., Li, H., & Guertin, D. A. (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metabolism*, 16(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.003>
- Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A. W., Krott, L. M., Nilsson, S. K., Brenner, M. B., Heeren, J., & Scheja, L. (2016). FGF21 lowers plasma triglycerides by accelerating lipoprotein catabolism in white and brown adipose tissues. *Cell Metabolism*, 23(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.006>
- Smith, W. S., Broadbridge, R., East, J. M., & Lee, A. G. (2002). Sarcolipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of Ca²⁺ by the Ca²⁺-ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 361(2). <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610277>
- Stager, M., & Cheviron, Z. A. (2020). Is there a role for sarcolipin in avian facultative thermogenesis in extreme cold? *Biology Letters*, 16(6). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0078>
- Szentirmai, E., & Kapas, L. (2017). The role of the brown adipose tissue in β₃-adrenergic receptor activation-induced sleep, metabolic and feeding responses. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01047-1>
- Torgerson, J. S., Hauptman, J., Boldrin, M. N., & Sjöström, L. (2004). XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) Study: A randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*, 27(1). <https://doi.org/10.2337/diacare.27.1.155>
- Tupling, A. R., Asahi, M., & MacLennan, D. H. (2002). Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47). <https://doi.org/10.1074/jbc.M206171200>
- Tupling, A. R., Bombardier, E., Gupta, S. C., Hussain, D., Vigna, C., Bloemberg, D., Quadrilatero, J., Trivieri, M. G., Babu, G. J., Backx, P. H., Periasamy, M., MacLennan, D. H., & Gramolini, A. O. (2011). Enhanced Ca²⁺ transport and muscle relaxation in skeletal muscle from sarcolipin-null mice. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 301(4). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00409.2010>

- Vaanholt, L. M., Daan, S., Schubert, K. A., & Visser, G. H. (2009). Metabolism and aging: Effects of cold exposure on metabolic rate, body composition, and longevity in mice. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(4). <https://doi.org/10.1086/589727>
- van der Lans, A. A. J. J., Hoeks, J., Brans, B., Vijgen, G. H. E. J., Visser, M. G. W., Vosselman, M. J., Hansen, J., Jörgensen, J. A., Wu, J., Mottaghy, F. M., Schrauwen, P., & van Marken Lichtenbelt, W. D. (2013). Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(8). <https://doi.org/10.1172/JCI68993>
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhomerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*, 360(15). <https://doi.org/10.1056/nejmoa0808718>
- VOet, D., & Voet, J. g. (2015). Biochemistry. In *John Wiley & Sons* (Vol. 4).
- von Essen, G., Lindsund, E., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313(5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00097.2017>
- Wang, Z., Ning, T., Song, A., Rutter, J., Wang, Q. A., & Jiang, L. (2020). Chronic cold exposure enhances glucose oxidation in brown adipose tissue. *EMBO Reports*, 21(11). <https://doi.org/10.15252/embr.202050085>
- Weir, M. A., Beyea, M. M., Gomes, T., Juurlink, D. N., Mamdani, M., Blake, P. G., Wald, R., & Garg, A. X. (2011). Orlistat and acute kidney injury: An analysis of 953 Patients. In *Archives of Internal Medicine* (Vol. 171, Issue 7). <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.103>
- World Health Organization. (2020). UNICEF/WHO/The World Bank Group joint child malnutrition estimates: levels and trends in child malnutrition: key findings of the 2020 edition.)
- Wynne, R. D., Brown, T., Braybrooke, R. M., Jones, S., Stott, D. A., & Thornton, G. M. (1995). An evaluation of the cardiovascular effects of sibutramine in normal volunteers. *Int J Obes*, 19(suppl 2), 144
- Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S., Hecht, R., Li, Y. S., Lindberg, R. A., Chen, J. L., Jung, D. Y., Zhang, Z., Ko, H. J., Kim, J. K., & Véniant, M. M. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(1). <https://doi.org/10.2337/db08-0392>
- Xu, Z., You, W., Zhou, Y., Chen, W., Wang, Y., & Shan, T. (2019). Cold-induced lipid dynamics and transcriptional programs in white adipose tissue. *BMC Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0693-x>
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., & Saito, M. (2011). Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity*, 19(1). <https://doi.org/10.1038/oby.2010.105>
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Okamatsu-Ogura, Y., Kameya, T., Kawai, Y., Miyagawa, M., Tsujisaki, M., & Saito, M. (2011). Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity*, 19(9). <https://doi.org/10.1038/oby.2011.125>
- Young, P., Arch, J. R. S., & Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, 167(1). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80822-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80822-4)
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. L., & Inesi, G. (1993). H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophysical Journal*, 64(4). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81489-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81489-9)
- Yu, X. X., Lewin, D. A., Forrest, W., & Adams, S. H. (2002). Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and β -oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from

differential gene expression and confirmation in vivo. *The FASEB Journal*, 16(2). <https://doi.org/10.1096/fj.01-0568com>

Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., & Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *The FASEB Journal*, 14(11). <https://doi.org/10.1096/fj.99-0834com>

Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., Zheng, X. X., Wheeler, M. B., Shulman, G. I., Chan, C. B., & Lowell, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00378-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00378-6)

Zhao, Z. J., Chi, Q. S., Liu, Q. S., Zheng, W. H., Liu, J. S., & Wang, D. H. (2014). The shift of thermoneutral zone in striped hamster acclimated to different temperatures. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084396>

Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., & Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700). <https://doi.org/10.1126/science.1100747>