

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů a člověka

Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Bc. Kristýna Beranová

**Dietně a teplotně podmíněné změny biologie hnědé tukové tkáně u dvou
myších kmenů s rozdílnou náchylností k obezitě**

**Diet and temperature induced changes in the biology of brown adipose
tissue in two mouse strains with different susceptibility to obesity**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Petra Janovská, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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 dne 29.4.2025

Bc. Kristýna Beranová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Janovské, PhD., za poskytnutí odborného vedení a cenných připomínek, za její trpělivost a vstřícnost během vypracovávání této práce. Mé poděkování dále patří celému kolektivu Oddělení biologie tukové tkáně, zejména Mgr. Elišce Haasové, Daně Šálkové a Mgr. Kristině Bardové, PhD., za ochotu, trpělivost a praktickou pomoc při provádění experimentů.

Zvláštní poděkování patří také mé rodině a příteli, kteří mi byli oporou nejen během psaní této práce, ale i po celou dobu studia.

Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Hnědá tuková tkáň (BAT) je termogenní orgán, který produkuje teplo prostřednictvím netřesové termogeneze (NST) využitím odpráhujícího proteinu 1 (UCP1), který umožňuje přeměnu energie na teplo místo tvorby ATP. Vzhledem k možnosti tak potenciálně ovlivňovat energetickou bilanci organismu, stala se BAT slibným cílem pro léčbu obezity a s ní spojených onemocnění. U myši s ablací UCP1 byly odhaleny další mechanismy, které pomáhají k NST, mezi které patří jalové cyklování spojené s lipogenezí a lipolýzou (lipidové cyklování). Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv má okolní teplota (30 °C, 22 °C, 8 °C) a dieta (standardní (ST) a s vysokým obsahem tuku (HF)) na velikost tukových kapének a expresi genů kódujících proteiny zapojené do lipidového cyklování u dvou myších kmenů (A/J a C57BL/6J) lišících se v citlivosti na rozvoj obezity a místem aktivace NST.

Hodnocení probíhalo na základě histologické analýzy morfologie lipidových kapének a měření genové exprese klíčových genů. Bylo zjištěno, že u myši krmených ST dietou chladová expozice zvyšovala počet a zmenšovala velikost lipidových kapének v BAT bez ohledu na myši kmen. HF dieta snižovala jejich velikost pouze při termoneutrální teplotě. Exprese *Ucp1* rostla s klesající teplotou, zatímco HF dieta expresi tlumila, přičemž A/J myši vykazovaly vyšší úroveň exprese než C57BL/6J. Všechny studované geny zvyšovaly expresi s klesající teplotou, avšak s odlišnou dynamikou mezi kmeny. Byly pozorovány rozdíly v zapojení drah tvorby glycerol-3-fosfátu, A/J myši využívaly dráhu přes *Pck1*, zatímco C57BL/6J spíše dráhu přes *Gk*. HF dieta celkově potlačovala chladovou odpověď, zejména u A/J myši. U C57BL/6J myši byla v chladu zvýšena exprese genů pro příjem mastných kyselin, lipogenezi a ukládání TAG, což odpovídalo i histologickým nálezům.

Výsledky naznačují, že mezi kmeny existují významné rozdíly ve strategiích adaptace BAT na chlad a dietní podmínky, a že A/J myši reagují na HF dietu výraznějším útlumem metabolické aktivity BAT než C57BL/6J myši.

Abstract

Brown adipose tissue (BAT) is a thermogenic organ that produces heat through non-shivering thermogenesis (NST) dependent on uncoupling protein 1 (UCP1), which enables the conversion of energy into heat instead of ATP production. Due to its potential to influence the organism's energy balance, BAT has become a promising target for the treatment of obesity and related metabolic diseases. In UCP1 knockout mice, alternative mechanisms supporting NST have been revealed, including futile cycling associated with lipogenesis and lipolysis (lipid cycling). The aim of this study was to investigate the impact of ambient temperature (30 °C, 22 °C, 8 °C) and diet (standard (ST) and high-fat (HF) diet) on the size of lipid droplets and the expression of genes encoding proteins involved in lipid cycling in two mouse strains (A/J and C57BL/6J), which differ in their susceptibility to obesity development and site of NST activation.

Evaluation included histological examination of lipid droplet morphology and analysis of gene expression. It was found that in mice fed the ST diet, cold exposure increased the number and decreased the size of lipid droplets in BAT regardless of the strain. The HF diet reduced droplet size only under thermoneutral conditions. *Ucp1* expression increased with decreasing temperature, while the HF diet suppressed its expression, with A/J mice showing higher expression levels than C57BL/6J. All studied genes showed increased expression at lower temperatures, although with different dynamics between the strains. Differences were observed in the involvement of glycerol-3-phosphate synthesizing pathways, with A/J mice preferentially utilizing the pathway via *Pck1*, while C57BL/6J mice favored the *Gk* pathway. The HF diet generally attenuated the cold-induced response, particularly in A/J mice. In contrast, in C57BL/6J mice, cold exposure increased the expression of genes related to fatty acid uptake, lipogenesis, and TAG storage, which was consistent with histological findings.

The results suggest that significant strain-specific differences exist in BAT adaptation strategies to cold and dietary conditions, and that A/J mice show a more pronounced suppression of BAT metabolic activity in response to the HF diet compared to C57BL/6J mice.

Použité zkratky

AC – adenylát cykláza

Acadl – gen kódující acyl-CoA dehydrogenázu (LCAD)

ACLY – ATP citrát lyáza

Acly – gen kódující ATP citrát lyázu

ACP – protein vázající acyl (z angl. acyl carrier protein)

AJ – k obezitě rezistentní myši kmen A/J

AMP – adenosinmonofosfát

AMPK – AMP aktivovaná proteinová kináza

ATGL – triacylglycerolová lipáza (z angl. adipose triglyceride lipase)

ATP – adenosintrifosfát

AR – adrenergní receptor

B6 – k obezitě náchylný myši kmen C57BL/6J

BAT – hnědá tuková tkáň (z angl. brown adipose tissue)

cAMP – cyklické AMP

CD36 – membránový protein odpovědný za transport mastných kyselin do buňky

Cd36 – gen kódující membránový protein odpovědný za transport mastných kyselin do buňky

CoA – koenzym A

CPT – karnitin-palmitoyl transferáza

CREB – protein vázající cAMP responsivní element (z angl. cAMP response element-binding protein)

DAG - diacylglycerol

DGAT – diacylglycerol acyltransferáza

Dgat – gen kódující diacylglycerol acyltransferázu

FABP – protein vázající mastné kyseliny v cytoplazmě (z angl. fatty acid binding protein)

FASN – syntetáza mastných kyselin (z angl. fatty acid synthase)

Fasn – gen kódující syntetázu mastných kyselin

FATP – protein transportující mastné kyseliny do buňky (z angl. fatty acid transporting protein)

G3P – glycerol-3-fosfát

Gk – gen kódující glycerol kinázu

GLUT – glukózový transportér

GyK – glycerol kináza

HF – vysokotuková (z angl. high-fat)

HSL – hormon senzitivní lipáza

LCAD – acyl-CoA dehydrogenáza pro MK s dlouhým řetězcem (z angl. long-chain acyl-CoA dehydrogenase)

LPL – lipoprotein lipáza

Lpl – gen kódující lipoprotein lipázu

MK – mastné kyseliny

MPC – mitochondriální pyruvátový přenašeč

mTORC1 – multiproteinový komplex – mechanistický cíl rapamycinu (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1)

Myf5 – myogenní faktor 5

NNT – nikotinamid nukleotid transhydrogenáza

NST – netřesová termogeneze (z angl. non-shivering termogenesis)

OAA - oxaloacetát

PC – pyruvát karboxyláza

Pck1 – gen kódující fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (PEPCK)

Pcx – gen kódující pyruvát karboxylázu (PC)

PDH – pyruvát dehydrogenáza

PEPCK - fosfoenolpyruvátkarboxykináza

PKA – protein kináza A

PLIN5– perilipin 5

Plin5 – gen kódující perilipin 5

Pnpla2 – gen kódující triacylglycerolovou lipázu (ATGL)

PPAR – receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory (z angl. peroxisome proliferator activated receptor)

PRDM1 – transkripční faktor podílející se na vývoji hnědých adipocytů (z angl. PR domain zinc finger protein 16)

SERCA – protonová pumpa pumpující Ca^{2+} zpět do sarkoplasmatického retikula za spotřeby ATP (z angl. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase)

ST – standardní

TAG – triacylglyceroly

TCA cyklus – cyklus trikarboxylových kyselin

TNF- α – prozánětlivý cytokin (z angl. tumor necrosis factor α)

UCP1 – odpřahující protein 1 (z angl. uncoupling protein 1)

Ucp1 – gen kódující odpřahující protein 1

VLDL – lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (z angl. very low density lipoproteins)

WAT – bílá tuková tkáň (z angl. white adipose tissue)

Obsah

Úvod	1
1. Literární přehled.....	2
1.1. Tuková tkáň.....	2
1.1.1. Bílá tuková tkáň.....	3
1.1.2. Běžová tuková tkáň	4
1.1.3. Hnědá tuková tkáň	5
1.2. Metabolismus hnědé tukové tkáně	9
1.2.1. Metabolismus glukózy	10
1.2.2. Metabolismus lipidů	13
1.3. Odlišnosti myších kmenů C57BL/6J a A/J	18
2. Cíle práce	20
3. Metody a materiál	20
3.1. Pokusná zvířata.....	20
3.2. Histologie.....	23
3.2.1. Barvení hematoxylinem a eosinem	23
3.2.2. Imunohistochemické barvení.....	24
3.2.3. Imunochemické fluorescenční barvení.....	26
3.3. Analýza genové exprese	28
3.3.1. Izolace RNA.....	28
3.3.2. Reverzní transkripce	29
3.3.3. Kvantitativní PCR.....	30
3.4. Statistická analýza.....	33
4. Výsledky.....	33
4.1. Velikost tukových kapének v adipocytech.....	33
4.2. Exprese <i>Ucp1</i>	36
4.3. Vliv teploty na metabolismus BAT v rámci daného genotypu.....	40
4.4. Vliv diety v kombinaci s teplotou na metabolismus BAT v rámci daného genotypu	43
4.5. Vliv genotypu a diety na metabolismus BAT za dané teploty.....	46
5. Diskuze.....	52
5.1. Vliv okolní teploty a diety na velikost tukových kapének v BAT	52

5.2.	Vliv okolní teploty a diety na míru exprese <i>Ucp1</i>	53
5.3.	Vliv okolní teploty na expresi metabolických genů v BAT.....	53
5.4.	Vliv okolní teploty a diety na expresi metabolických genů v BAT	54
5.5.	Vliv genotypu a diety na expresi metabolických genů v BAT za dané teploty.	55
6.	Závěr	56
7.	Seznam literatury.....	59

Úvod

Tuková tkáň je velmi významným orgánem, mezi jehož důležité funkce patří tepelná izolace a ochrana vnitřních orgánů, sekrece hormonů a ukládání energie ve formě triacylglycerolů do tukových kapének, díky čemuž mohou někteří živočichové přežít týdny bez potravy. Ačkoli v dobách nedostatku byla tuková tkáň cenným pomocníkem, dnes častěji přispívá ke vzniku obezity. Obezita patří mezi nejrozšířenější tzv. civilizační choroby (GBD 2015 Obesity Collaborators 2017). Může být podmíněna geneticky (*Loos a Bouchard 2003), nyní je ale především spojena s vysokým energetickým příjmem a sníženou pohybovou aktivitou. Obezita s sebou nese zvýšená rizika vzniku dalších zdravotních komplikací, jako například kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus druhého typu, hypertenze a další patologie souhrnně označované jako metabolický syndrom, a tak kromě samotného ohrožení zdraví jedince představuje i zátěž pro zdravotnický systém (*Luna-Luna et al. 2015). Vzhledem k narůstajícímu počtu pacientů s obezitou se zvyšují i výdaje na léčbu a vývoj nových léčiv. Je tedy důležité lépe porozumět energetickému metabolismu jak celého organismu, tak jednotlivých orgánů, a zkoumat jeho možné ovlivnění pro zmírnění negativního dopadu nadměrného energetického příjmu.

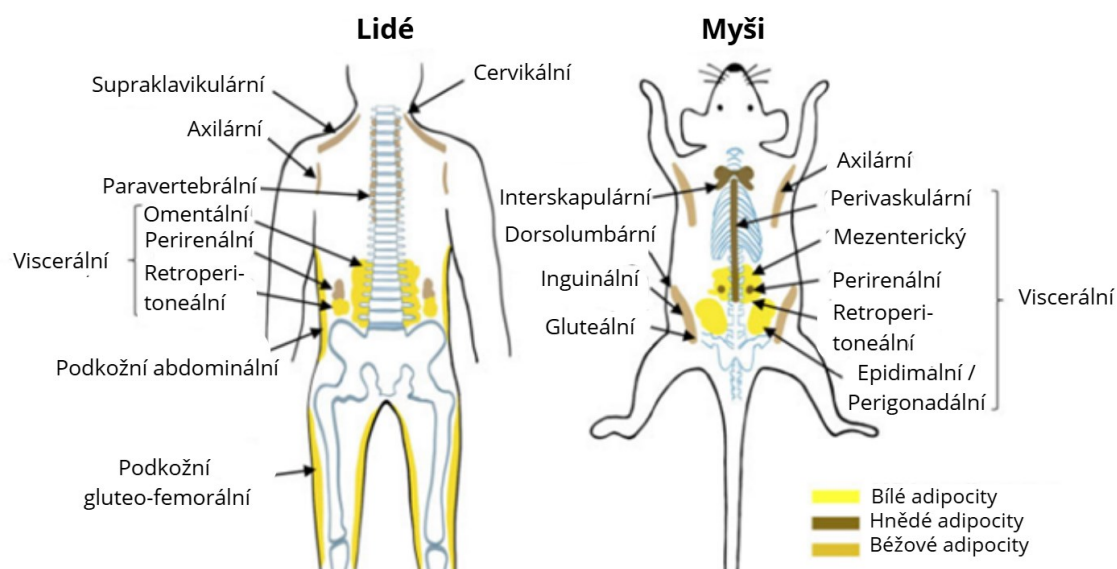
Jednou z možností zvýšení energetického výdeje je spuštění termoregulačních mechanismů. Kromě nejznámější třesové termogeneze kosterního svalstva využívá organismus i jiné regulační mechanismy. Patří mezi ně tzv. netřesová termogeneze (NST), zprostředkovaná mechanismy, které nejsou spojené se svalovou prací. Mezi nejznámější patří NST zprostředkovaná odpráhujícím proteinem 1 (UCP1) v hnědé tukové tkáni fungující na principu zkratování protonového gradientu za uvolnění tepla. V posledních letech se však klade důraz na výzkum a možné ovlivnění disipace energie přes jalové cykly, kdy jsou aktivní nejméně dvě protichůdné metabolické dráhy, jejichž reakce nejsou v energetické rovnováze a tím dochází ke ztrátám ATP.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci vlivu složení diety a okolní teploty na metabolické dráhy studované pomocí genové exprese v hnědé tukové tkáni u myši, které se liší v náchylnosti na rozvoj obezity.

1. Literární přehled

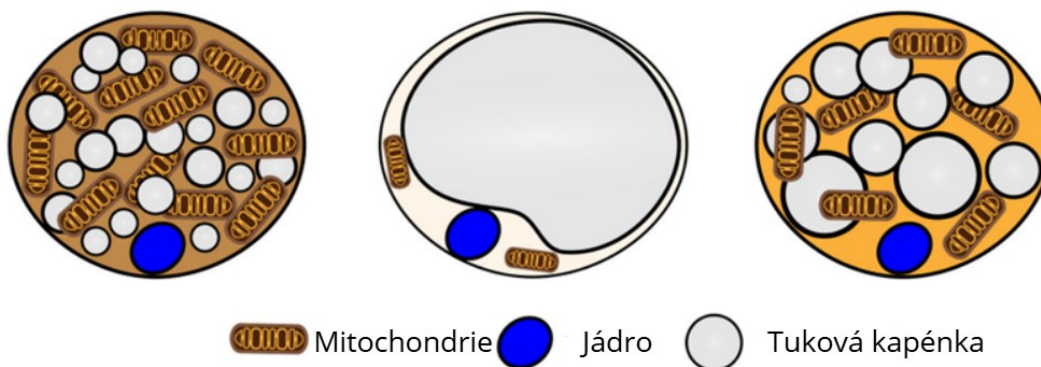
1.1. Tuková tkáň

Tuková tkáň je druh pojivové tkáně složené z adipocytů, obklopených stroma-vaskulární frakcí, která zahrnuje další typy buněk např. preadipocyty, fibroblasty, leukocyty, makrofágy a také cévní systém kapilár (Curat et al. 2004; Han et al. 2015). Tukové buňky jsou koncentrovány v tukových depech nazývaných dle jejich výskytu v rámci organismu (viz Obr. č. 1.).



Obr č. 1. Rozdílné rozmístění tukových dep u člověka a myši. Převzato a upraveno podle (*Cheong a Xu 2021)

Tuková tkáň může růst během celého života. Uvádí se, že zatímco během raného vývoje se tuková tkáň zvětšuje primárně hyperplázií (zmnožením buněk), v dospělosti se počet adipocytů spíše nemění a tkáň tedy roste pomocí hypertrofie (zvětšování buněk) (Spalding et al. 2008; Knittle et al. 1979). Z morfologického hlediska můžeme tukovou tkáň rozdělit (viz Obr. č. 2) na bílou (WAT, z angl. white adipose tissue), hnědou (BAT, z angl. brown adipose tissue) a běžovou (také brite; z angl. brown-in-white), jejíž mechanismus vzniku doposud není zcela objasněn.

Hnědý adipocyt**Bílý adipocyt****Běžový adipocyt**

Obr. č. 2. Morfologický rozdíl mezi hnědými, bílými a béžovými adipocyty. (Převzato z Jung et al. 2019)

1.1.1. Bílá tuková tkáň

Adipocyt bílé tukové tkáně je typicky většího průměru, obsahuje jednu velkou tukovou kapénku (unilokulární fenotyp) lemovanou slabou vrstvou cytoplazmy obsahující jádro a malé množství mitochondrií a endoplazmatického retikula. V porovnání s jinými typy buněk jsou ostatní orgány výrazně redukovány (*Cinti 2008; 2009). Bílé adipocyty většinou vznikají z mezenchymálních prekursorových buněk, které neexprimují myogenní faktor 5 (*Myf5*-), který je jeden z hlavních transkripčních faktorů embryogeneze pro vývoj svalů (Ott et al. 1991; Seale et al. 2008).

WAT slouží primárně k ukládání přebytečné energie ve formě triacylglycerolů (TAG) do tukových kapének při energetickém nadbytku a vysoké koncentraci glukózy v krvi. Naopak pokud organismus nemá dostatek energie, nebo je z jiného důvodu WAT stimulována sympatickým nervovým systémem, dochází k uvolňování volných mastných kyselin (MK), které slouží jako zdroj energie pro ostatní tkáň (viz kapitola 2.2.2. Metabolismus lipidů). Pokud energetický příjem dlouhodobě převyšuje energetický výdej a zásobní kapacita WAT je vyčerpána, organismus je nucen energii ve formě TAG ukládat do jiných tkání (nejčastěji do jater, kosterního svalstva) (Kim et al. 2000). WAT dělíme na dva hlavní druhy dle výskytu na viscerální, která se vyskytuje okolo vnitřních orgánů, a subkutánní (podkožní) (viz Obr. č. 1).

Kromě skladování energie má WAT i endokrinní funkce – sekretuje adipokiny a cytokiny, které mají metabolický vliv na celý organismus. WAT produkuje prozánětlivé i protizánětlivé faktory. Mezi vylučované adipokiny patří např. adiponektin, resistin, leptin nebo visfatin, cytokiny sekretované WAT jsou např. TNF- α (z angl. tumor necrosis factor α) nebo interleukin

6, což jsou markery zánětlivé reakce a jsou zvýšené v séru i WAT u obézních jedinců (*Cottam et al. 2004).

Adiponektin je protein podílející se na metabolismu lipidů a sacharidů. V kosterním svalstvu stimuluje utilizaci glukózy prostřednictvím AMP aktivované proteinové kinázy (AMPK; viz kapitola 2.2.1. metabolismus glukózy) a také transport MK a jejich následnou oxidaci. Tím dokáže zvyšovat inzulínovou senzitivitu (Yamauchi et al. 2001; 2002). Tento hormon má také anti-aterosklerotické účinky (Yamauchi et al. 2003). Hladina adiponektinu je snižena u obézních lidí (Arita et al. 1999). Leptin, nazývaný také jako hormon sytosti, je kódovaný *ob* genem, který úzce souvisí s obezitou (Zhang et al. 1994). Leptin má schopnost překračovat hematoencefalickou bariéru a přenáší signál přes leptinové receptory v hypotalamu, kde se nachází hlavní centrum sytosti. Díky leptinovému signálu je řízena chuť k jídlu a tím i celotělová energetická rovnováha. Množství leptinu přímo koreluje s množstvím tukové tkáně (Cowley et al. 2001). Antagonisticky k leptinu působí ghrelin, který je produkován v žaludku (Nakazato et al. 2001). Resistin působí prozánětlivě a zvyšuje inzulínovou rezistenci (Steppan et al. 2001). Posledním zmíněným adipokinem je visfatin, objevený nejpozději ze všech zmíněných. Je produkován primárně ve viscerální WAT. Váže se na inzulínový receptor, a tím ho aktivuje, zprostředkovává tak příjem glukózy do buněk. Jeho koncentrace v plazmě se také zvyšuje při rozvoji obezity (Fukuhara et al. 2005).

1.1.2. Běžová tuková tkáň

Běžový adipocyt se v aktivovaném stavu svou morfologií podobá hnědému adipocyту, lze v něm stimulovat expresi *Ucp1* aktivací $\beta 3$ adrenergního receptoru vystavením chladu či farmakologicky a může se tak podílet na netřesové termogenezi. Běžové adipocyty nalézáme primárně v bílých tukových depech, kde vznikají procesem hnědnutí. Pro proces hnědnutí byly navrženy dvě hypotézy. První hypotéza předpokládá, že dochází k přeměně z již diferencovaných adipocytů v rámci WAT po stimulaci adrenergních receptorů chladem nebo jinými aktivátory (Cousin et al. 1992). Jean Himms-Hagen ve svém experimentu popisuje přeměnu unilokulárních adipocytů v WAT na multilokulární po aktivaci $\beta 3$ adrenergního receptoru, čímž se přiklání k hypotéze transdiferenciace (Himms-Hagen et al. 2000). Transdiferenciace se považuje za proces reverzibilní a z běžové se po vymizení stresoru opět stává bílá tkáň (Rosenwald et al. 2013). Skutečnost, že by mělo docházet k procesu transdiferenciace někteří autoři vysvětlují výskytem tzv. paucilokulárních adipocytů po vystavení chladu, které obsahují mitochondrie typické pro WAT i UCP1 pozitivní mitochondrie vyskytující se v BAT (Frontini et al. 2013). Některé výzkumy na základě

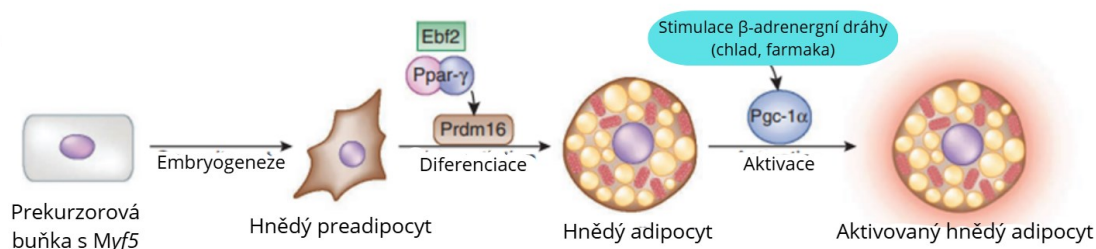
pozorování *in vivo* a *in vitro* však hypotézu transdiferenciace vyvracejí a protlačují hypotézu vzniku béžových buněk z nediferenciovaných prekurzorů adipocytů (Petrovic et al. 2010).

1.1.3. Hnědá tuková tkáň

BAT byla objevena již roku 1551 Conradem Gessnerem, že se však jedná o termoregulační orgán bylo zjištěno až o 4 století později v roce 1961 (*Trayhurn 2017). Větší pozornost dostala až po roce 2009, kdy byla kromě novorozenců nalezena i u dospělých lidských jedinců (Saito et al. 2009; Virtanen et al. 2009). Následně se na aktivaci BAT začalo nahlížet jako na možnost navýšení energetického výdeje, což by mohlo vést ke snížení tělesné hmotnosti. První studie se zdály nadějné, opravdu bylo zjištěno, že aktivovaná BAT přispívá k navýšení spotřeby energie, ovšem jak další výzkumy prokázaly, BAT se chladem podařila aktivovat pouze u neobézních jedinců. (Chen et al. 2013; Ouellet et al. 2012; Carey et al. 2013). V posledních letech bylo navrženo mnoho dalších způsobů zvýšení spotřeby energie na zvířecích modelech (např. konverze bílých adipocytů na béžové), zda se dají aplikovat i na lidský organismus však ukáží až další výzkumy (Rosenwald et al. 2013).

Adipocyty hnědé tukové tkáně bývají v průměru menší, obsahují velké množství lipidových kapének (multilokulární fenotyp) a v jejich cytoplazmě se nachází velké množství mitochondrií (viz Obr. č. 2) obsahujících cytochromy zodpovědné za hnědé zbarvení tkáně (Joel a Ball 1962). Mitochondrie BAT mají oproti mitochondriím WAT zhuštěné krysty a na jejich vnitřní membráně se nachází již zmiňovaný UCP1, který přenáší vodíkové protony dovnitř mitochondrie za uvolňování tepla. Hnědé adipocyty vznikají z mezenchymálních prekurzorových buněk, které exprimují již zmíněný myogenní faktor 5 (*Myf5*+) (viz Obr. č. 3). Na procesu vývoje hnědých adipocytů se dále podílí transkripční koregulátor PRDM16 a jaderný receptor PPAR γ , na který se váže. Pokud je PRDM16 ektopicky exprimován v buňkách kosterního svalstva, dochází k jejich diferenciaci na hnědé adipocyty (Seale et al. 2008). PPAR γ je jedna ze tří izoform jaderných receptorů PPAR (receptory aktivované peroxizomovými proliferátory, z angl. peroxisome proliferator activated receptors), což jsou transkripční faktory, které se kromě vývoje BAT podílí i na indukci genů klíčových pro hnědé adipocyty (*Ucp1*) a zároveň potlačování genů typických pro bílé adipocyty (resistin)

(Vernochet et al. 2009).



Obr. č. 3. Diferenciace hnědého adipocytu z prekurzorové buňky s myogenním faktorem *Myf5*⁺. (Převzato a upraveno podle *Harms a Seale 2013)

Hlavní funkce hnědé tukové tkáně je již zmíněná regulace tělesné teploty pomocí NST řízené sympatickou nervovou soustavou, konkrétně se jedná o aktivaci uvolněným noradrenalinem (Hsieh a Carlson 1957). NST může být zahájena v reakci na chlad, ale i v reakci na dietu s vysokým obsahem tuku (vysokotukovou dietou; HF dietou).

V reakci na vnější vlivy se BAT plasticity mění. Během dlouhodobého vystavování chladu či vysokého energetického příjmu se zvyšuje aktivita sympatických nervů inervujících BAT, dochází k hypertrofii (mitochondriogeneze, tvorba UCP1, zvýšená vaskularizace,...) a hyperlázii, a tím i k navýšení kapacity pro NST. Naopak při termoneutrální teplotě, u obézních zvířat a v průběhu laktace BAT atrofuje (Himms-Hagen 1990; Trayhurn 1989). Atrofie BAT se projevuje významným snížením mitochondrií a jejich proteinů (např. lipoprotein lipázy (LPL), UCP1) a postupně ztrácejícím se multilokulárním fenotypem. Atrofie je z tohoto důvodu také popisována jako „bělání“, protože hnědý adipocyt přejímá fenotyp bílého adipocytu (Kotzbeck et al. 2018).

1.1.3.1. Netřesová termogeneze zprostředkovaná UCP1 vyvolaná chladem

NST zprostředkovaná UCP1 je děj, kdy dochází k produkci tepla za ztráty energie ve formě protonového gradientu, který je jinak využíván k tvorbě ATP. Po chladové aklimatizaci je vzruch z termoreceptorů pomocí senzorických nervů přenášen do hypotalamu, odkud je řízena teplota organismu (viz Obr. č. 4). Hypotalamus v reakci na tento vzruch aktivuje sympatické nervy a dojde k uvolnění noradrenalinu. Noradrenalin se váže na β -adrenergní receptory na povrchu tukové buňky, které aktivují cAMP signální dráhu. Prostřednictvím cAMP uvolněného po aktivaci adenylát cyklázy (AC) je aktivována protein kináza A (PKA), která se

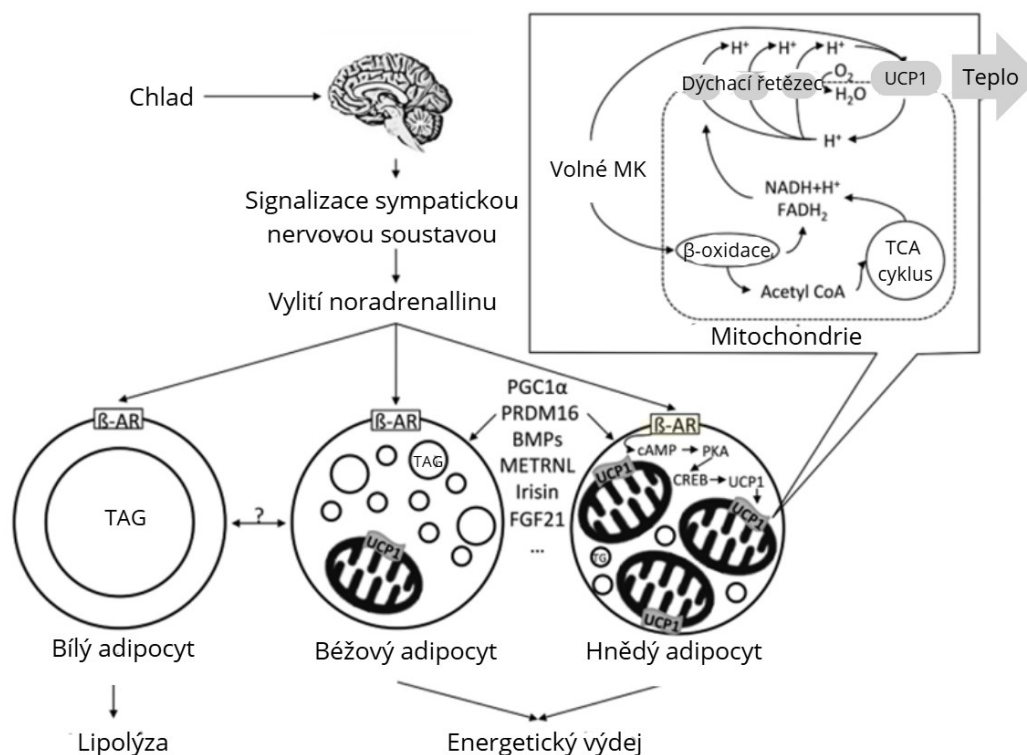
dále podílí na procesu lipolýzy, a to jak v bílých, tak hnědých adipocytech (viz kapitola 2.2.2. Lipolýza). PKA dále v hnědých adipocytech fosforyluje CREB (cAMP response element-binding protein), který spouští transkripci *Ucp1* (Cao et al. 2004). Při chladové aklimatizaci se proto zvyšuje i množství UCP1 (Milner a Trayhurn 1989). Kromě aktivace exprese *Ucp1* v hnědých adipocytech cAMP signální dráha v hnědých preadipocytech zvyšuje expresi ribonukleotid reduktázy, genu pro klíčový enzym syntézy DNA, a tím stimuluje jejich proliferaci (Fredriksson a Nedergaard 2002). Noradrenalin má na buňky BAT nejen proliferální, ale také anti-apoptotické účinky (Lindquist a Rehnmark 1998).

UCP1 je transmembránový protein o velikosti 33kDa. Monomer má šest transmembránových podjednotek, C i N konec se nachází v intermembránovém prostoru. Zvýšená exprese *Ucp1* sama o sobě nezaručuje NST, pro aktivaci proteinu je třeba ho stimulovat mastnými kyselinami. Po navázání MK UCP1 tvoří dimer (Chomiki et al. 2001) a mění svou konformaci (Divakaruni et al. 2012). Tato změna struktury umožní vznik hydrofilního kanálu, kterým mohou procházet vodíkové ionty nahromaděné v intermembránovém prostoru zpět do mitochondrií. Tyto ionty jsou pumpovány do prostoru mezi membránami během pracujícího elektron-transportního řetězce (dýchacího řetězce), který je poháněn produkty cyklu trikarboxylových kyselin (TCA cyklus) (NADH, FADH₂), a jsou následně využívány ATP syntázou pro syntézu ATP. Odpráhnutím dýchacího řetězce pomocí UCP1 tedy místo energie ukládané ve formě ATP vzniká energie tepelná (Xue et al. 2022).

Kromě UCP1 rozeznáváme i jiné izoformy UCP číslované 2-6. Významná izoforma pro metabolismus je také UCP2, kterou nacházíme ve velké míře v β buňkách pankreatu, kde negativně reguluje sekreci inzulinu (Zhang et al. 2001). Také se nachází v srdci, WAT a malé míře i v BAT, kde je esenciální pro upřednostnění β -oxidace před glykolýzou po adrenergní stimulaci (Caron et al. 2017). UCP2 se také podílí na regulaci tvorby reaktivních forem kyslíku (Arsenijevic et al. 2000). V BAT nacházíme i izoformu 3, která je primárně exprimovaná v kosterním svalstvu, její funkce v metabolismu ale zůstává neznámá (Gong et al. 2000; Cline et al. 2001).

Aktivovaná BAT zvyšuje počet mitochondrií a tím i svou oxidační kapacitu. Spotřebovává více kyslíku, následkem je snížení třesové termogeneze (která se při vystavení chladu aktivuje jako první) a následně její nahrazení za NST, což je při dlouhodobějším pobytu v chladu žádoucí, zamezí se tak svalovému vyčerpání či zranění (Smith 1964; Néchad 1987).

V posledních letech bylo zjištěno, že UCP1 nebude jediný protein zodpovědný za NST, některé savčí druhy (např. prase) postrádají funkční gen pro UCP1 a přesto mají jejich adipocyty termogenní funkci (Gaudry et al. 2017) viz kapitola 1.2. Metabolismus hnědé tukové tkáně.



Obr. č. 4. Schéma aktivace NST, závislé na UCP1, pomocí chladové adaptace (převzato a upraveno podle Fenzl a Kiefer 2014)

1.1.3.2. Netřesová termogeneze vyvolaná vysokotukovou dietou

Udržení tělesné teploty je hlavní důvod pro stimulaci NST, avšak může být stimulována i v reakci na zvýšené množství lipidových partikul v krvi za účelem udržení energetické homeostázy a zabránění nechtěnému příbytku na váze. Příjem HF diety, stejně jako vystavování chladu, spustil NST přes β -adrenergní receptory (Bachman et al. 2002) a zvýšil množství UCP1 v BAT a tím i spotřebu kyslíku (von Essen et al. 2017). Stravou vyvolaná termogeneze tedy do velké míry závisí na přítomnosti UCP1 a jeho aktivaci (Matthias et al. 2000). Bylo zjištěno, že BAT je aktivována především HF dietou obsahující polynenasycené mastné kyseliny, studie prokázaly zvýšenou oxidační kapacitu mitochondrií, vyšší množství UCP1 a také aktivitu LPLm (Mercer a Trayhurn 1987; Matsuo 1996; Sadurskis et al. 1995). Také množství uloženého tuku je nižší v porovnání s HF dietou obsahující především

nasyčené či mononenasycené MK (Matsuo et al. 1995). Rozdíly mezi jednotlivými polynenasycenými MK nebyly ve vlivu na aktivaci BAT prokázány (Takeuchi et al. 1996).

Existenci mechanismu, podle něhož BAT spaluje přebytečné kalorie při pozitivní energetické bilanci, zpochybnil ve své práci L. P. Kozak (*Kozak 2010). Na základě experimentů provedených na myších s ablací UCP1, či na myších s částečně odstraněnou BAT, dospěl k závěru, že úloha BAT v rámci dietou indukované termogeneze je nepravděpodobná. Výsledky jeho studie naznačují, že ačkoli se termogeneze vyvolaná příjmem potravy může podílet na akutní regulaci příjmu potravy, není pravděpodobné, že by protein UCP1 sehrával významnou fyziologickou roli v prevenci přibývání na tělesné hmotnosti při nadměrném kalorickém příjmu. I přesto se však ukazuje, že terapeutická stimulace NST, ať již zprostředkované UCP1, či na UCP1 nezávislé, by mohla být klinicky využívána při regulaci tělesné hmotnosti, a to bez ohledu na platnost tradičního konceptu termogeneze vyvolané stravou (Bardova et al. 2024; Kozak 2010).

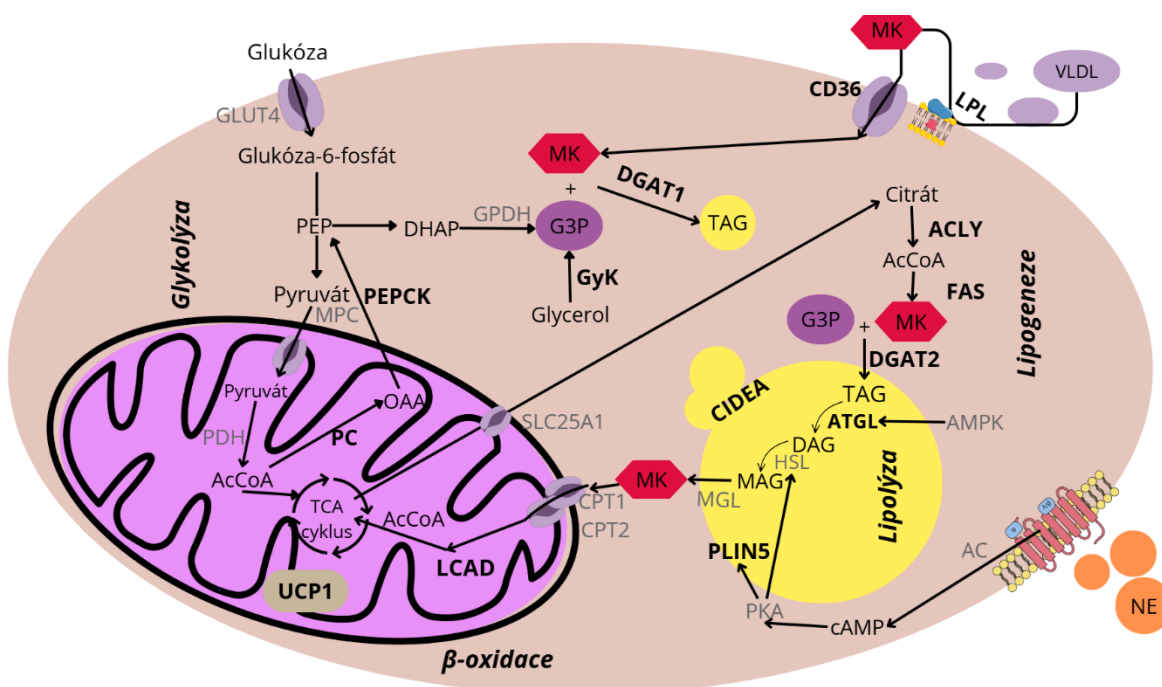
Kromě HF diety může být NST vyvolána i jinými látkami např. kapsaicinem či katechiny, které se nacházejí v zeleném čaji (Choo 2003; Yoshida et al. 1988).

1.2. Metabolismus hnědé tukové tkáně

Hnědá tuková tkáň je známá především díky své schopnosti vytvářet teplo odpálením dýchacího řetězce pomocí UCP1 za ztráty protonového gradientu k tvorbě ATP. Vzhledem k jeho objevu u lidí v dospělosti se v posledních letech dostává do popředí jako možnost ovlivnění problému narůstající světové obezity. V posledních letech se dostává do popředí i výzkum jalových (prázdných) cyklů, kdy jsou ve stejnou dobu aktivní alespoň dvě protichůdné metabolické dráhy, jejichž reakce mají za následek ztrátu energie. Název pro tyto cykly vychází z původního přesvědčení, že jalové cykly jsou „biologickou hříčkou“, která přispívá pouze ke ztrátě cenné energie. S dalšími výzkumy bylo zjištěno, že jalové cykly regulují koncentraci metabolitů a modulují energetickou homeostázu, či slouží jako pufrovací systémy (*Sharma et al. 2024). Jalové cykly můžeme pozorovat napříč živočišnými druhy např. u hmyzu, či v topném orgánu pelagické dravé ryby (Morrissette et al. 2003; Surholt et al. 1991). U myší bylo zjištěno cyklování mezi *de novo* syntézou MK a jejich oxidací v kosterním svalu (Solinas et al. 2004). U hlodavců a lidí pozorujeme lipidový cyklus mezi játry a tukovou tkání a také intraadipocytární cyklus triglyceridů a mastných kyselin (TAG/MK cyklus), jehož jeden cyklus stojí organismus 8 molekul ATP (Reidy a Weber 2002; Elia et al. 1987). Intraadipocytární cyklus reguluje hladiny volných MK, čímž může

předcházet lipotoxicitě, která vzniká při rychlém uvolňování MK (Braun et al. 2018). U UCP1 deficientních myší se také jako kompenzační dráha termogeneze zvyšuje prázdné cyklování TAG/MK v BAT, kdy BAT je zásobována mastnými kyselinami z WAT (Oeckl et al. 2022). Mezi další proteiny podílející se na jalovém cyklování a NST patří i protonová pumpa SERCA (z angl. sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) v kosterním svalstvu u hlodavců (Lervik et al. 2012; Ikeda et al. 2017). V poslední době došlo ke zvýšení zájmu o jalové cykly spojené s konverzí kreatinu a kreatinfosfátu, které též přispívají k NST v tukové tkáni, především u UCP1 deficientních myší, a k řízení celotělové energetické homeostázy (Kazak et al. 2015).

Za hlavní energetické substráty v BAT jsou považovány lipidy a glukóza (metabolické dráhy viz Obr. č. 5).



Obr. č. 5. Přehled metabolických drah BAT; AcCoA – acetyl koenzym A, DHAP – dihydroxyacetonfosfát, G3P – glycerol-3-fosfát, GPDH – glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, MK – mastné kyseliny, NE – noradrenalin, OAA – oxaloacetát, PEP – fosfoenolpyruvát, TAG – triacylglycerol, TCA cyklus – cyklus trikarboxylových kyselin. Tučně jsou zvýrazněny proteiny, u nichž byla v této diplomové práci měřena genová exprese. Obrázek byl vytvořen v programu Canva.

1.2.1. Metabolismus glukózy

Glukóza je monosacharid se šesti uhlíky, v přírodě se vyskytující ve formě D-glukózy a je základním, pro některé buňky jediným, zdrojem energie. V BAT může být skladována ve formě glykogenu (Chitraju et al. 2020). Glykogen je hlavním zásobním polysacharidem

živočichů, nachází se především v játrech, kde slouží jako zásobárna energie v případě hladovění či poklesu glukózy v krvi, a v kosterním svalstvu. Výhodou glykogenu je díky jeho větvené struktuře rychlejší mobilizace energie oproti TAG, a její zisk za anaerobních podmínek (glykolýza), což je velmi důležité např. pro pracující kosterní svalstvo.

V posledních letech bylo zjištěno, že glykogen hraje významnou roli v NST, především u běžových adipocytů (Zhuo et al. 2024). Enzymy glykogen fosforyláza a UDP glukóza pyrofosforyláza zodpovědné za glykogenolýzu a glykogenezi jsou po chronickém vystavení chladu u potkanů navýšené, což poukazuje na zvýšený glykogenový metabolismus (Labbé et al. 2015).

Glukóza v BAT je metabolizována pro tvorbu energie za použití glykolýzy i mitochondriální oxidace a také je důležitým zdrojem uhlíku pro produkci glycerolu a acetyl-CoA potřebných pro lipogenezi. Do BAT je přenášena pomocí glukózových transportérů při dvou odlišných metabolických stavech – inzulinem stimulovaný příjem při nasycení a noradrenalinem stimulovaný příjem při aktivní termogenezi. V BAT se primárně vyskytuje GLUT4, exprese jehož genu je aktivována inzulinem, ale vyskytují se zde i GLUT1 a GLUT3. GLUT4 přenašeče v BAT nejvíce odpovídají na chladovou aklimatizaci zvýšením genové exprese pro tento protein, zatímco GLUT přenašeče v bílé tukové tkáni na snížení teploty nereagují (Orava et al. 2011; Daikoku et al. 2000). Počet glukózových přenašečů se zvyšuje nejen po vystavení chladu, ale také farmakologickou stimulací β_3 adrenergního receptoru, která navyšuje i množství enzymů souvisejících s glykolýzou (Fujimoto et al. 2019). V souladu s tím další studie prokázala, že denervace BAT zamezuje zvýšení příjmu glukózy při chladové adaptaci (Shimizu et al. 1993). Po transportu glukózy do cytosolu buněk je fosforylována pomocí hexokinázy 2 na glukózu-6-fosfát. Takto fosforylovaná již nemůže buňku opustit a dále prochází sledem devíti metabolických reakcí. Rychlost určujícím krokem glykolýzy je přeměna fruktóza-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát katalyzovaná enzymem fosfofruktokináza. Tato reakce rozhoduje o vstupu substrátu do glykolýzy, protože tento produkt v buňce již nemá jiné využití. Fosfofruktokináza je silně regulovaný enzym, mezi její inhibitory patří ATP a citrát, což jsou ukazatelé dostatečné energie, naopak je aktivována při vysoké koncentraci AMP či ADP (Sale a Denton 1985). Sled reakcí je zakončen reakcí enzymu pyruvátkináza, která z fosfoenolpyruvátu štěpí fosfátovou skupinu za vzniku pyruvátu, který je dále transportován do mitochondrie, kde je dále metabolizován.

1.2.1.1. Oxidace pyruvátu

Pyruvát z procesu glykolýzy vstupuje do mitochondrie přes mitochondriální pyruvátový přenašeč (MPC) nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně tvořený dvěma geny *Mpc1* a *Mpc2* formující heterodimer (*Tavoulari et al. 2023). Po chladové aklimatizaci se v BAT u myši signifikantně zvyšuje exprese těchto genů, naopak delece genu *Mpc1* v BAT vede ke snížené schopnosti termogeneze oproti kontrolním myším (Wang et al. 2020; Panic et al. 2020).

V mitochondriální matrix je pyruvát metabolizován pyruvát dehydrogenázou (PDH) za vzniku acetyl-CoA, který dále vstupuje do TCA cyklu, kde je oxidován až na oxid uhličitý za vzniku energie formě ATP a redukovaných koenzymů (NADH, FADH₂), které dále vstupují do dýchacího řetězce a vedou k pumpování protonů do intermembránového prostoru.

Protonový gradient je dále využit k tvorbě energie ve formě ATP. Bylo zjištěno, že aktivita PDH v BAT u potkana je vyšší než ve svalech, srdci či WAT (Cooney et al. 1993). Inzulin také stimuluje příjem glukózy do tkání, aktivaci PDH a oxidaci glukózy, která byla až 10x vyšší po stimulaci inzulinem (Shackney a Joel 1966). Aktivita PDH může být potlačena pyruvát kinázou, o které bylo zjištěno, že exprese jejích podtypů *Pdk2* a *Pdk4* může být též indukována chladovou aklimatizací, či farmakologickou stimulací β 3 adrenergní dráhy.

Někteří autoři se domnívají, že se tak řídí rovnováha mezi oxidací glukózy a tvorbou TAG (Hao et al. 2015; Barquissau et al. 2016). V lidské BAT v porovnání s WAT je exprimováno velké množství mitochondriálních proteinů souvisejících s TCA cyklem a oxidativní fosforylací (Müller et al. 2016).

Pyruvát také může být anaplerotickou reakcí pyruvát karboxylázy (PC; kódována genem *Pcx*) přeměňován na oxaloacetát (OAA), který je poté inkorporován do TCA cyklu reakcí s acetyl-CoA za vzniku citrátu, a tím zvyšuje kapacitu TCA cyklu (Cannon a Nedergaard 1979). Navýšení kapacity TCA cyklu by mohl být jeden z hlavních důvodů příjmu glukózy hnědými adipocyty po stimulaci noradrenalinem, naznačují to i výsledky studie, kdy po zablokování oxidace MK noradrenalinem stimulovaný příjem glukózy neprobíhal (Marette a Bukowiecki 1991). Acetyl-CoA nejen takto vstupuje do TCA cyklu, ale je také důležitý pro *de novo* syntézu MK. Vzniklý OAA může být také využit glukoneogenetickou drahou za účasti enzymu fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK; kódována genem *Pck1*) na přeměnu na intermediát glykolýzy – fosfoenolpyruvát, a tím též přispívat tvorbě G3P pro syntézu TAG (viz kapitola 1.2.2.1. Lipogeneze).

1.2.2. Metabolismus lipidů

Lipidy jsou estery alkoholů a mastných kyselin. Nejvyšší podíl lipidů přijímaných potravou tvoří TAG. Ačkoli hnědé adipocyty mají schopnost syntetizovat MK *de novo* lipogenezí, hlavním zdrojem je zde příjem MK z cirkulujících TAG v krevním řečišti, kde se pohybují jako chylomikrony nebo VLDL partikule, které jsou hydrolyzované lipoprotein lipázou (*Williams 2008). Aktivita LPL je v BAT stimulována noradrenalinem (Carneheim et al. 1984). U hlodavců je BAT považována za jeden z hlavních orgánů pro odstraňování TAG z krve, dokonce při chladové aklimatizaci spotřebovává více TAG než kosterní svalstvo (Festuccia et al. 2009; Bartelt et al. 2011). Poté co LPL hydrolyzuje TAG, jsou volné mastné kyseliny vychytávány pomocí CD36 a transportovány dovnitř buněk. (Febbraio et al. 1999). CD36 je regulátor příjmu MK do buněk a jeho odlišné genetické varianty jsou asociovány s rozdíly hmotnosti u lidí (Bokor et al. 2010). Na vstupu MK do buněk se také podílí další přenašeče – proteiny transportující mastné kyseliny (FATP), které přenášejí především dlouhé a velmi dlouhé mastné kyseliny. Existuje 6 izoform FATP, izoforma 1 se nachází v BAT a je důležitá pro NST. (Wu et al. 2006).

Mastné kyseliny v cytoplazmě nejsou volné, ale musí být z důvodu jejich hydrofobicity vázány na proteiny. K tomu slouží proteiny vázající mastné kyseliny (FABP). Adipocyty hnědé tukové tkáně obsahují konkrétně izoformy FABP3, FABP4 a FABP5. FABP3 je klíčová pro oxidaci MK a exprese jejího genu je velmi zvýšena po chladové expozici (Vergnes et al. 2011; Daikoku et al. 1997). Nejvíce zastoupená je izoforma 4, která se kromě adipocytů exprimuje v makrofázích (Yamamoto et al. 2009). U FABP4 deficientních myši se nerozvíjí inzulinová rezistence indukovaná obezitou, hyperglykémie ani ateroskleróza (Boord et al. 2002; Hotamisligil et al. 1996). Naopak plazmatické koncentrace tohoto proteinu se zvyšují u lidí s metabolickým syndromem, hyperlipidemií, či diabetem druhého typu (Cabr   et al. 2007; 2008; 2010). FABP5 podporuje lipolýzu a *de novo* syntézu MK. Také bylo zjištěno, že jeho míra exprese je úzce spojena s malignitou v některých typech rakoviny (Senga et al. 2018).

1.2.2.1. Lipogeneze

Lipogeneze je označení pro syntézu MK a následnou syntézu TAG, která slouží především k tvorbě energetických zásob např. při nadměrném množství glukózy v krvi. Skladování energie ve formě TAG je výhodné hned z několika důvodů. Nejsou osmoticky aktivní, proto jich může být uloženo velké množství, a také 1g TAG skladuje více než dvojnásobek energie oproti 1 g glykogenu či proteinu. Rychlost syntézy závisí na množství a složení přijímané

potravy. Dieta bohatá na cukry syntézu stimuluje, zatímco zvýšený příjem polynenasycených MK ve stravě *de novo* lipogenezi snižuje (Jump et al. 1994; Boogaerts et al. 1984).

Syntéza MK se skládá z osmi enzymatických reakcí, které probíhají v cytosolu. Výchozí látkou pro syntézu TAG, odehrávající se v játrech a tukové tkáni, jsou MK a glycerol.

Výchozím substrátem pro syntézu MK je acetyl-CoA, který opouští mitochondrii ve formě citrátu za účasti citrát/malát antiporteru SLC25A1. Exprese genu pro SLC25A1 je snížena při krmení HF dietou (Verkerke et al. 2024). Cytosolický citrát je následně konvertován pomocí ATP citrát lyázy (ACLY) zpět na acetyl-CoA (Wang et al. 2010). Exprese *Acly* je regulována multiproteinovým komplexem mTORC1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1), který se v BAT aktivuje po chladové expozici a jeho delece způsobuje zhoršení glukózového i lipidového metabolismu a blokuje chladem vyvolaný růst BAT (Labbé et al. 2016). U lidí i myši byla prokázána zvýšená exprese *Acly* v BAT po chladové expozici (Chondronikola et al. 2016; Yu et al. 2002).

V prvním kroku je acetyl-CoA konvertován enzymem acetyl-CoA karboxyláza na malonyl-CoA. Tento enzym je klíčovým pro celý proces lipogeneze a podřizuje se mnoha regulacím (*Wang et al. 2022). Pokud jsou splněny všechny podmínky pro tvorbu malonyl-CoA, započne syntéza mastných kyselin, která probíhá na enzymu syntáza MK (FASN – z angl. fatty acid synthase). FASN je jeden z největších komplexů v buňce, má sedm enzymatických aktivit a protein vázající acyl (ACP), který zajišťuje přenos acylových zbytků. Jedná se o dimer, tudíž jsou syntetizovány dvě MK najednou (Smith et al. 1985). Při každém přidání dvouuhlíkatého řetězce na MK se spotřebují 2 NADHP.

Primární produkt syntézy MK je palmitát, jehož řetězec má 16 uhlíků, proces prodlužování je tedy potřeba šestkrát zopakovat. FASN nedokáže syntetizovat MK delší než 16 uhlíků, proto delší MK vznikají následnou elongací v endoplazmatickém retikulu či mitochondrii. Elongace se liší přenašeči acylových skupin a v případě mitochondriální elongace i zdrojem přidávaného uhlíkového řetězce. V endoplazmatickém retikulu kromě elongace probíhá i proces zvaný desaturace, kdy na mastné kyselině vznikají dvojné vazby. Tento proces obstarávají enzymy desaturázy, avšak savčí desaturázy nejsou schopny desaturace na delší vzdálenost, než je devět uhlíků od karboxylové skupiny, proto nenasycené MK s dvojnou vazbou dále než 9 uhlíků musíme přijímat v potravě. Mezi tyto esenciální MK patří např. linoleová či linolenová (*Das 2006).

TAG jsou tvořeny třemi MK navázanými na molekule glycerolu, jejich syntéza probíhá procesem esterifikace. Prvním krokem je vazba MK na CoA za spotřeby ATP zprostředkovaná enzymem acyl-CoA syntáza. Následně probíhá postupné připojování acyl-CoA na hydroxylové skupiny glycerol-3-fosfátu (G3P). G3P vzniká z dihydroxyacetonfosfátu (DHAP) za účasti enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenáza. DHAP je tvořen z fosfoenolpyruvátu, který může být produktem PEPCK z glukoneogenní dráhy, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.1.1. Oxidace pyruvátu. Pokud v buňce dojde k poklesu glykolýzy, může být G3P tvořen i glyceroneogenezí z pyruvátu či aminokyselin (Nye et al 2008). Bylo zjištěno, že v BAT a játrech se nachází enzym glycerol kináza (GyK; kódována genem *Gk*), který fosforyluje glycerol na G3P (Festuccia et al. 2003). GyK je také důležitá pro termogenní kapacitu, stimuluje expresi *Ucp1* v béžových adipocytech (Iwase et al. 2020). Reakci G3P s acyl-CoA zprostředkovávají enzymy acyltransferázy a za každou reakci zodpovídá jiný druh acyltransferázy, nazývaný dle jeho substrátů. Na první esterifikaci se podílí glycerol-3-fosfát acyltransferáza, dále pak monoacylglycerol acyltransferáza a poté diacylglycerol acyltransferáza (DGAT) za vzniku finálního produktu TAG (*Coleman a Lee 2004).

Existují dva evolučně nepříbuzné enzymy DGAT1 a DGAT2, které katalyzují stejnou reakci a podílejí se na syntéze téměř všech TAG. Důvody existence obou enzymů jsou nejasné, ale výzkumy prokázaly, že oba enzymy jsou důležité pro správnou funkci organismu. DGAT2 by mohl hrát zásadní roli v esterifikaci *de novo* syntetizovaných MK, zatímco DGAT1 esterifikuje MK přijaté buňkami. Deficience DGAT2 u myši není kompatibilní s životem, naproti tomu DGAT1 deficientní myši jsou životaschopné a jejich adipozita je snížena o 50%, neobjevuje se u nich dietou indukovaná obezita (Stone et al. 2004; Smith et al. 2000). Množství TAG je u DGAT1 deficientní myši kromě tukové tkáně sníženo i v kosterním svalstvu či játrech (Chen et al. 2002).

Nasyntetizované TAG se ukládají do lipidových kapének, tento děj zprostředkovává protein CIDEA. Myši s delecí genu pro tento protein vykazují vyšší metabolickou aktivitu, lipolýzu a jsou rezistentní k obezitě indukované HF dietou. Myši s touto delecí mají snížené množství uloženého tuku a jsou citlivé na chlad. CIDEA kromě regulace růstu tukových kapének negativně reguluje i funkci UCP1 v mitochondriích, a tím se podílí na řízení produkce tepla přes NST v BAT (Zhou et al. 2003; Wu et al. 2014).

1.2.2.2. Lipolýza

Lipolýza je katabolický proces, při kterém dochází k hydrolýze esterových vazeb triacylglycerolů za vzniku volných MK, glycerolu a energie. Ve střevě probíhá za účelem

trávení potravy, v adipocytech za účelem získání energie či jako součást jalového cyklu. Buňky tyto metabolity využívají endogenně s výjimkou WAT, která může MK exportovat do oběhu pro ostatní tkáně v době lačnění, cvičení či vystavení chladu. Lipolýza může probíhat samovolně, pak mluvíme o konstitutivní lipolýze, nebo může být hormonálně řízená (Lafontan a Langin 2009). Pro proces lipolýzy organismus využívá enzymy zvané lipázy, kterých existuje několik druhů (rozeptáno dále). Lipolýza je řízena sympatickým nervovým systémem, kdy dochází k produkci katecholaminů, ale může být stimulována i natriuretickým peptidem (Sengen et al. 2003). V případě katecholaminů dochází k vazbě na adrenergní receptory, které jsou spřažené s G proteiny. Známe pět typů adrenergních receptorů (AR) α_1 , α_2 , β_1 , β_2 a β_3 , v hnědé tukové tkáni se signalizace lipolýzy účastní β -AR, u hlodavců se v lipolýze primárně zapojuje adrenergní receptor β_3 , β_1 spíše přispívá proliferaci adipocytů v BAT (Bengtsson et al. 2000; Ueta et al. 2012), které subtypy se podílejí na lipolýze v lidské BAT není doposud jasné. Některé výzkumy předpokládají primární účast β_1 receptorů (Riis-Vestergaard et al. 2020), jiné β_2 (Straat et al. 2023).

Po stimulaci β -AR dochází k aktivaci G proteinu a tím k aktivaci adenylát cyklázy (AC), která tvoří cAMP. Po navýšení koncentrace cAMP v buňce dochází k aktivaci PKA, která fosforyluje hormon senzitivní lipázu (HSL), a tím ji aktivuje. Dále PKA fosforyluje protein perilipin (PLIN), který se nachází v jednovrstevné membráně tukové kapénky v adipocytech a bez hormonálního podnětu snižuje konstitutivní lipolýzu (Greenberg et al. 1991). Fosforylovaný perilipin umožňuje translokaci HSL do tukové kapénky, a tím i štěpení TAG na DAG nebo až na monoacylglyceroly, HSL disponuje oběma metabolickými aktivitami, ačkoli hydrolýza DAG je preferovanější (Sztalryd et al. 2003; Fredrikson a Belfrage 1983).

Další lipázou, která dokáže štěpit TAG na DAG je triacylglycerolová lipáza (ATGL; kódována genem *Pnpla2*), jejíž aktivita je řízena prostřednictvím AMPK. Hydrolýza pomocí ATGL je rychlost-limitujícím krokem lipolýzy. Ke své plné funkčnosti vyžaduje ATGL koaktivační protein CGI-58 (Lass et al. 2006), také existují proteiny (G0S2), které funkci ATGL inhibují (Yang et al. 2010). CGI-58 je vázaný na perilipin a k jeho uvolnění dochází až po fosforylaci pomocí PKA (Granneman et al. 2007). Uvádí se, že ATGL je důležitá pro NST v BAT, protože uvolněné MK během lipolýzy aktivují UCP1, a tím dochází k produkci tepla (viz kapitola 1.1.3.1. Netřesová termogeneze zprostředkovaná UCP1 vyvolaná chladem), avšak některé studie toto tvrzení na základě výzkumu vyvracejí (Schweiger et al. 2006; Shin et al. 2017). Bylo zjištěno, že ATGL významně přispívá k aktivaci hnědé tukové tkáně a udržuje její fenotyp (Ahmadian et al. 2011). Lipolýza je také regulována prostřednictvím

AMPK, která slouží jako senzor pro poměr AMP a ATP. Pokud koncentrace AMP vzroste, AMPK je aktivována a fosforyluje ATGL i HSL (Davies et al. 1995). Vzniklé DAG jsou následně hydrolyzovány na monoacylglyceroly pomocí HSL a dále na glycerol a volné MK pomocí monoacylglycerolové lipázy (MGL) (Karlsson et al. 1997). Glycerol vzniklý procesem lipolýzy je v BAT pomocí GyK přeměňován na G3P, nebo putuje krevním řečištěm do jater, kde je postupně přeměněn na glyceraldehyd-3-fosfát, který může vstoupit do glykolýzy (Edwards a Mohiuddin 2025).

Pokud dojde k aktivaci lipolýzy natriuretickými peptidy, dochází k aktivaci cGMP signální dráhy a je aktivována protein kináza G, která fosforyluje perilipin a HSL. Tuto cestu regulace nacházíme u primátů včetně lidí, ovšem ne u ostatních savců (Sengenès et al. 2002;2003).

1.2.2.3. β -oxidace

Osudy volných mastných kyselin v adipocytech BAT mohou být různé, jedním z nich je následná β -oxidace. Kromě volných MK z lipolýzy bylo zjištěno, že BAT pro proces termogeneze MK přijímá z okolí. Jak již bylo zmíněno, ATGL pravděpodobně v BAT nehraje esenciální roli pro proces termogeneze, avšak v WAT se jeví nepostradatelně, jelikož se podílí na zásobování BAT mastnými kyselinami (Ahmadian et al. 2011; Ouellet et al. 2012). Protože je β -oxidace katabolický děj, který se odehrává v mitochondriích, je třeba v prvním kroku transportovat MK z cytosolu do mitochondrií. Pro transport je nutné nejdříve MK aktivovat, a to vazbou na koenzym A (CoA) za vzniku acyl-CoA. Ve vnější mitochondriální membráně se nachází karnitin-palmitoyl transferáza 1 (CPT1), která přenese acylovou skupinu z CoA na karnitin za vzniku acyl-karnitinu, ten je dále přenášen prostřednictvím karnitin-acylkarnitin translokázy přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix. V matrix je acyl-karnitin opět převeden na acyl-CoA a volný karnitin pomocí CPT2. Dochází tak k regeneraci CPT1 a cyklus se může opakovat (Longo et al. 2006). MK s krátkým řetězcem prostupují do mitochondrií nezávisle na karnitinových přenašečích (*Schönfeld a Wojtczak 2016). Po vstupu MK do mitochondrie probíhá jejich degradace β -oxidací. Prvním krokem je dehydrogenace katalyzovaná acyl-CoA dehydrogenázou pro dlouhé řetězce (LCAD; kódovaná genem *Acadl*), při které vzniká trans-enoyl-CoA a FADH_2 . Zatímco u myší hraje LCAD významnou roli v oxidaci nenasycených mastných kyselin, u lidí je její exprese minimální, což naznačuje, že v lidských tkáních je LCAD méně významná v oxidaci dlouhých mastných kyselin (Chegary et al. 2009). Po dehydrogenaci pomocí LCAD následuje hydratace dvojné vazby enzymem enoyl-CoA hydratáza a druhá dehydrogenace za vzniku β -ketoacyl-CoA a NADH. Poté thioláza štěpí β -ketoacyl-CoA za uvolnění acetyl-CoA, který

vstupuje do TCA cyklu. Tento čtyřkrokový cyklus se opakuje, dokud není mastná kyselina rozštěpena na dva acetyl-CoA.

Kromě výše popsané mitochondriální oxidace MK v BAT při chladové indukci nacházíme i peroxisomální oxidaci, kde jsou primárně oxidovány MK s velmi dlouhým řetězcem (Nedergaard et al. 1980). Množství katalázy, která je považována za marker peroxisomů, se při chladové aklimatizaci u potkanů ukázalo jako velmi zvýšené (Ahlabo a Barnard 1971). Peroxisomy nedisponují TCA cyklem ani dýchacím řetězcem, proto jsou MK v kratší podobě dopravovány do mitochondrie, aby mohlo dojít k plnému využití energie. Dle některých vědců se peroxisomální β -oxidace podílí na termogenezi nezávislé na UCP1. Vzniklé FADH₂ jsou přenášeny flavoproteinem acyl-CoA oxidázou přímo na O₂ za vzniku peroxidu vodíku a energie je uvolňována ve formě tepla (*Wanders a Tager 1998).

1.3. Odlišnosti myších kmenů C57BL/6J a A/J

Myší kmeny jsou široce využívány ve výzkumu, zvláště kmen C57BL/6J (B6), který patří k nejvíce používaným, a to i ve výzkumu metabolismu. B6 myši jsou často používány jako kmen citlivý na rozvoj obezity indukované dietou na rozdíl od méně používaného kmene A/J (AJ), který je k rozvoji obezity rezistentní (Surwit et al. 1988). Kromě odlišnosti v reakci na podávání diety s vysokým obsahem tuku se tyto kmeny liší v reakci na vystavení chladu, což je spojováno s jejich schopností využití NST v BAT a jiných orgánech (Janovska et al. 2023).

Myší kmen B6 se také využívá ke studiu obezity, inzulinové rezistence, diabetu typu 2 a kardiovaskulárních chorob díky predispozici k těmto zmíněným chorobám (Surwit et al. 1988; 1995). Tento kmen vykazuje výraznou akumulaci tukové tkáně zejména viscerálního tuku a tuku v játrech (Waller-Evans et al. 2013). S obezitou vyvolanou HF dietou jsou spojené další komorbidity včetně zvýšené hladiny TAG v krvi a inzulinové rezistence. Kmen B6 je také náchylný k chronickému zánětu, což je častý doprovodný faktor obezity. B6 myši vykazují zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF- α a interleukin 6) (Avtanski et al. 2019).

Dalším rozdílem těchto dvou linií je množství leptinu v plazmě. AJ myši na HF dietu reagují okamžitým výrazným navýšením produkce leptinu v WAT, a tím dochází k navýšení koncentrace v plazmě. U B6 linie dochází i přes větší tukové zásoby k pomalému nárustu koncentrace, zvyšuje se adipozita, hyperglykémie a hyperinzuliémie. Po 14 dnech na HF dietě je množství leptinu stále 2x nižší než u AJ myši (Surwit et al. 1997; Watson et al. 2000). Po 8 týdnech krmení HF dietou dochází u kmene B6 k rezistenci na periferních tkáních a

k potlačení příjmu potravy je potřeba vyšší hladina leptinu. Po 19 týdnech konzumace HF diety dochází k centrálnímu snížení citlivosti na leptin (Lin et al. 2000). U obou kmenů došlo po změně diety ze standardní (ST) na HF k navýšení příjmu, myši AJ na rozdíl od B6 myši vykazovaly schopnost regulovat příjem potravy zpět na výchozí úroveň během 3 dnů, což koreluje s nižším množstvím leptinu u B6 v porovnání s AJ, a to by mohlo být jedním z hlavních důvodů pro schopnost udržení hmotnosti u AJ myši (DeRuisseau et al. 2004). HF dieta u obou kmenů vyvolala zvýšení exprese *Ucp1*, přičemž u kmene AJ byla indukce výraznější. Spolu se zvýšením exprese *Ucp1* v hnědých adipocytech, dochází při krmení HF dietou i ke zvýšení exprese *Ucp2* v bílé tukové tkáni, ovšem pouze u kmene AJ, což by mohlo značit další rozdíl ve způsobu spalování přebytečné energie (Surwit et al. 1998). Dieta s vysokým obsahem tuku negativně ovlivnila expresi β 3-adrenergických receptorů a aktivitu AC, přičemž výraznější dopad byl zaznamenán u kmene B6. Při farmakologické aktivaci β 3-adrenergní dráhy agonistou CL316,243 je myší kmen AJ na rozdíl od kmene B6 plně chráněn před rozvojem obezity (Collins et al. 1997). AJ kmen je ale při krmení nízkotukovou dietou na rozdíl od B6 náchylný k hypotermii při chladové aklimatizaci. Výsledky genové exprese u AJ myši krmených HF dietou ukazují aktivaci oxidace MK v kosterním svalstvu při chladové aklimatizaci (Kus et al. 2008). Studie z roku 2023 ukazuje, že myší kmeny AJ a B6 se pravděpodobně liší v preferovaném mechanismu NST při chladové aklimatizaci. Přestože hladiny UCP1 v BAT byly u obou kmenů podobné a exprese *Ucp1* byla dokonce vyšší u AJ, NST v BAT byla aktivována pouze u B6 myši. U AJ myši byla absence této odpovědi kompenzována NST v kosterním svalstvu, která byla spojena se zvýšenou oxidací lipidů a zvýšenou expresí genu pro sarkolipin (Janovska et al. 2023). Množství svalové hmoty je 40-45% tělesné hmotnosti (Uchitomi et al. 2019), v případě, že se potvrdí účinnost svalové NST, lze uvažovat o souvislosti s rezistencí AJ k obezitě (Janovska et al. 2023; Bardova et al. 2024).

Kmen B6 nese mutaci v genu pro mitochondriální nikotinamid nukleotid transhydrogenázu (NNT), která se podílí na udržování buněčné redoxní homeostázy a ochraně proti oxidačnímu stresu. NNT využívá protonový gradient napříč vnitřní mitochondriální membránou k přenosu redukčních ekvivalentů z NADH na NADP⁺, čímž dochází k tvorbě NADPH, klíčového kofaktoru pro biosyntézu lipidů, nukleotidů a dalších biomolekul. Delece genu kódující NNT je v dostupné literatuře spojena s rozvojem glukózové intolerance (Ronchi et al. 2013).

2. Cíle práce

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci projektu zaměřeného na zapojení NST ve svalu jako odpověď na aklimatizaci na okolní teplotu, a to u dvou myších modelů AJ a B6 lišících se v rozvoji obezity. Hlavní cíl této práce byl zaměřen na charakterizaci metabolismu v BAT, základního orgánu NST, ve vztahu k možnému zapojení lipidového cyklování.

Vzhledem k tomu, že již bylo ukázáno, že AJ myši ve srovnání s B6 myšmi minimálně aktivují NST zprostředkovanou UCP1 v BAT, mohl by se tento kmen podobat myším s delecí genu pro UCP1, kde bylo prokázáno, že TAG/MK cyklování je zapojeno do NST a celkového energetického výdeje v této tkáni (Oeckl et al. 2022; Janovska et al. 2023).

Specifické cíle práce byly stanoveny:

- 1) Zjistit vliv okolní teploty a diety na velikost tukových kapének adipocytů v rámci genotypu.
- 2) Porovnat vliv okolní teploty a diety na expresi *Ucp1* v rámci genotypu a mezi jednotlivými kmeny.
- 3) Popsat vliv okolní teploty na metabolismus BAT v rámci daného genotypu
- 4) Popsat vliv diety v kombinaci s vlivem okolní teploty v rámci genotypu na metabolismus v BAT.
- 5) Zjistit, jaký vliv bude mít genetické pozadí na efekt diety v rámci dané okolní teploty na metabolismus v BAT

3. Metody a materiál

3.1. Pokusná zvířata

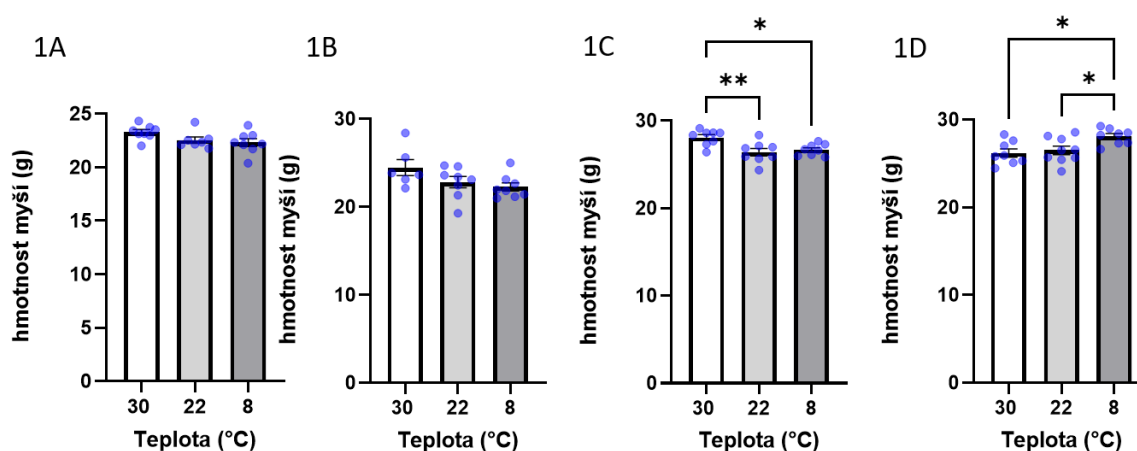
Pro experimenty byly použity laboratorní kmeny myší B6 (dovoz Taconic, Dánsko) se sklonem k rozvoji obezity a AJ (dovoz Inotiv, Nizozemí), které jsou k dietou indukované obezitě rezistentní. Pokus zahrnoval 94 myší, 49 B6 a 45 AJ. Samice v tomto pokusu nejsou zahrnuty z důvodu velkého počtu skupin, zůstává to tedy předmětem pro budoucí studie. Myši byly přivezeny ve stáří 5 týdnů. V prvním týdnu byly myši aklimatizovány po transportu na nové prostředí ve 22 °C a byly krmeny ST dietou (STD, Ssniff R/M-H z Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Německo; metabolizovatelná energie 13MJ/kg). Experiment započal aklimatizací myší na 3 týdny v termoneutrální teplotě (30 °C) ve stáří 6 týdnů. Během této doby byly myši z každého kmene rozděleny podle tělesné hmotnosti do 6 skupin, které se

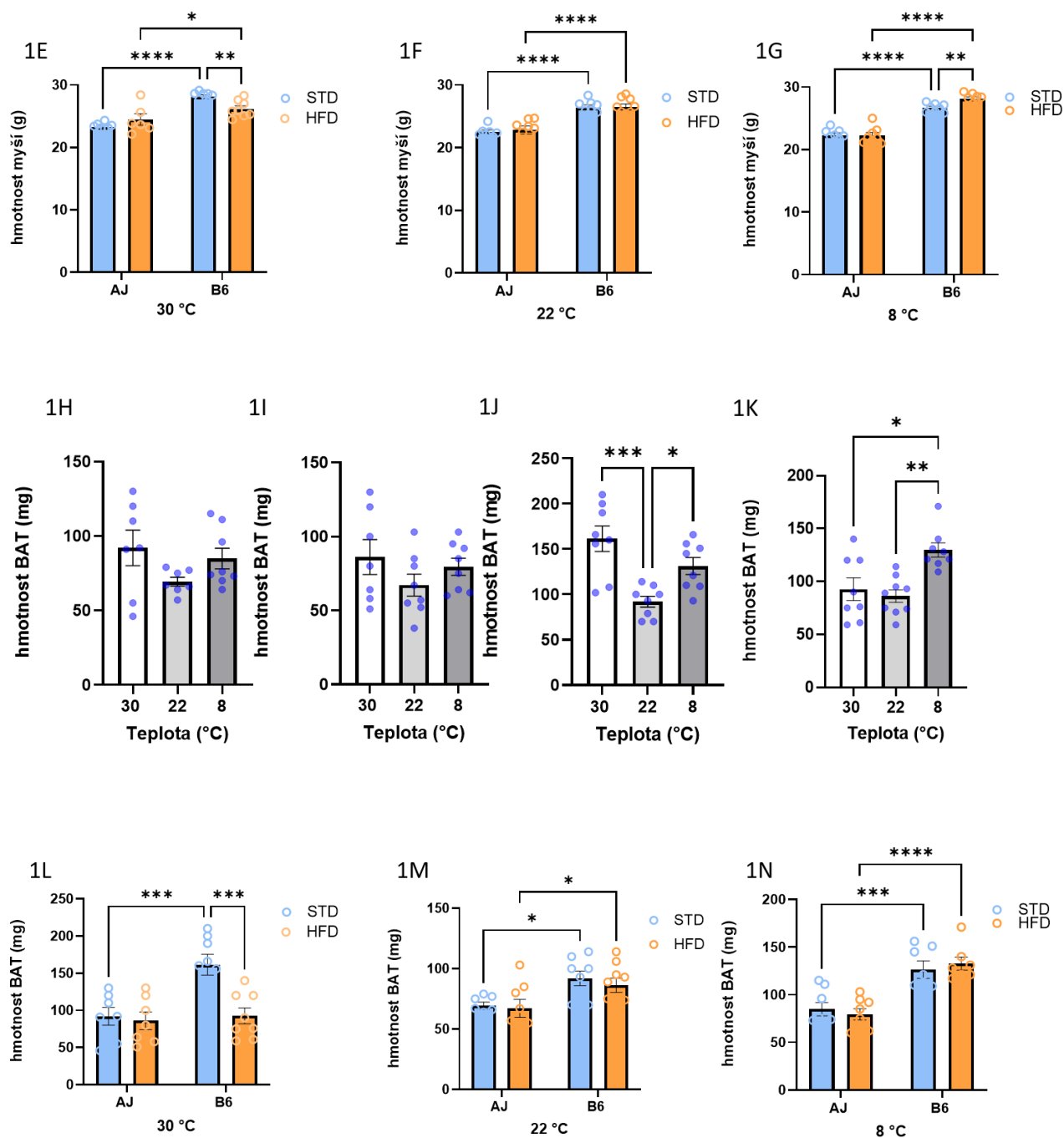
v následující části experimentu lišily dietou a okolní teplotou (viz Tabulka č.1). V polovině doby aklimatizace ve 30 °C byl myším voperován čip pro měření tělesné hmotnosti a po rekonvalescenci byly umístěny do přístroje nepřímé kalorimetrie do teploty 30 °C (vyhodnocení měření není součástí této práce). Celkem po 3 týdnech pobytu v termoneutrální teplotě byla polovině myši změněna ST dieta na HF dietu (připravená v FGÚ; využívaná v Ruzickova et al. 2004), a druhý den 2/3 myši okolní teplota (viz Tabulka č.1.), ve které byly ponechány 14 dní. Na konci experimentu byly myši po uspaní éterem usmrčeny prostřížením trachey a karotid kvůli odběru krve a ostatních orgánů, pro následné analýzy, kdy část vzorků byla zmrazena v tekutém dusíku a uložena v -80 °C k pozdějšímu použití pro qPCR (viz kapitola 4.3. Analýza genové exprese) a část ponechána ve formalinu a později použita k histologickým analýzám (viz kapitola 4.2. Histologie). Vzorky BAT byly využity pro analýzy v rámci této diplomové práce.

myší kmen	A/J						C57BL/6J					
teplota (°C)	30		22		8		30		22		8	
dieta	ST	HF	ST	HF	ST	HF	ST	HF	ST	HF	ST	HF
počet vzorků	8	6	7	8	8	8	8	8	8	9	8	8

Tabulka č.1. Rozdělení pokusných myši

Myši kmene B6 měly ve všech případech diety i teploty vyšší tělesnou hmotnost i hmotnost BAT (Grafy 1E-G, 1L-1N). U kmene AJ na rozdíl od kmene B6 docházelo se snižující se teplotou k poklesu hmotnosti (Grafy 1A-1D). Hmotnost BAT byla v průměru nejnížší ve 22 °C a to napříč kmeny i dietami (Grafy 1H-1K).





Grafy č. 1. Srovnání tělesné hmotnosti a hmotnosti BAT pokusných myší; 1A - AJ, ST dieta; 1B – AJ HF dieta; 1C – B6 ST dieta; 1D - B6 HF dieta; 1E – 30 °C; Graf 1F – 22 °C; Graf 1G – 8 °C. 1H - AJ, ST dieta; 1I – AJ HF dieta; 1J – B6 ST dieta; 1K - B6 HF dieta; 1L – 30 °C; Graf 1M – 22 °C; Graf 1N – 8 °C; *Data pro vytvoření těchto grafů byla převzata od Mgr. K. Bardové, PhD.*

Tato část experimentu proběhla před začátkem mé diplomové práce a byla provedena pod vedením Mgr. K. Bardové, PhD.



Obr. č. 6. Schéma pokusu; obrázek byl vytvořen v programu Canva.

3.2. Histologie

Pro histologickou analýzu byly vzorky BAT po odběru 24 hodin fixovány ve formalinu (Merck KGaA, Německo), následně dehydratovány a zality do parafrínu (*Ihned po ukončení experimentu – D. Šálková*). Řezy o tloušťce 3 μm byly řezány na mikrotomu Leica RM2235 (Leica Biosystems, ČR).

3.2.1. Barvení hematoxylinem a eosinem

Barvení hematoxylinem a eosinem je založeno na rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných kompartmentů. Eosin je růžové acidické barvivo mající afinitu k bazickým strukturám buňky jako například cytoplazma. Naproti tomu hematoxylin je modrofialové bazické barvivo s afinitou k acidickým strukturám jako je jádro. Díky kontrastnímu zobrazení buněčných struktur lze toto barvení použít k vyhodnocení velikosti tukových kapének ve tkáni.

Řezy hnědé tukové tkáně byly nejprve deparafrinovány a hydratovány v sestupné alkoholové řadě (2x xylen 15 minut $\rightarrow$ 2x 96% etanol 10 minut $\rightarrow$ 75% etanol 10 minut $\rightarrow$ 50% etanol 10 minut $\rightarrow$ oplach v destilované vodě) a následně barveny hematoxylinem po dobu 5 minut a opláchnuty pod tekoucí vodou. Následovala inkubace s eosinem po dobu 5 min a oplach kohoutkovou vodou po dobu 1 min. Obarvené vzorky byly opět dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (50% ethanol $\rightarrow$ 75% ethanol $\rightarrow$ 96% ethanol) v každém roztoku po dobu 30 s, usušeny v termostatu při 37 °C a zamontovány. Snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus BX53 záznamovým zařízením DP74 při zvětšení 200x. Histologické vzorky byly vyhodnoceny za zaslepených podmínek, aby bylo zajištěno objektivní hodnocení.

Distribuce a velikost tukových kapének byla v rámci skupiny porovnána a vzorek s průměrnou velikostí a obvyklou distribucí byl vybrán jako reprezentativní.

Přístroje a materiál	
OlympusBX53	Olympus, Japonsko

Roztoky	
xylén	Penta, ČR
96% ethanol	Penta, ČR
75% etanol	Penta, ČR
50% etanol	Penta, ČR
hematoxylin (haematoxylin solution Gill III)	Merck KGaA, Německo
eosin (Eosin-Y aqueous solution 0,5%)	Merck KGaA, Německo
montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium)	Merck KGaA, Německo

3.2.2. Imunohistochemické barvení

Imunohistochemické barvení slouží k detekci konkrétní bílkoviny za pomoci protilátek.

K detekci byla použita nepřímá třístupňová metoda založena na principu vazby primární protilátky na antigen dané bílkoviny a následné vazby sekundární biotinylované protilátky, na kterou se při inkubaci ABC silnou vazbou váže avidin-enzymový komplex. Barevného odlišení dosáhneme reakcí s DAB (diaminobenzicín), který se působením peroxidázy, která je součástí enzymového komplexu, změní na produkt hnědé barvy.

Barvení protilátkou proti UCP1

Řezy byly nejprve deparafinovány a hydratovány v sestupné alkoholové řadě (2x xylén 15 minut → 2x 96% etanol 10 minut → 75% etanol 10 minut → 50% etanol 10 minut → oplach v destilované vodě). Následně se vzorky inkubovaly 2x 15 minut při 95 °C v citrátovém pufru. Po zchlazení kyvet (přibližně 20 minut) se vzorky 2x promyly v destilované vodě a po dobu 10 minut se inkubovaly v 3 % H₂O₂ v metanolu pro zablokování endogenní funkce peroxidázy. Následoval proplach v PBS s přidaným 0,05% Tween, který umožňuje vstup protilátky do mitochondrie, po dobu 20 minut a poté oplach čistým PBS po dobu 15 minut. Pro blokaci nespecifické vazby primární a sekundární protilátky bylo na sklíčka nanášeno 10% kozí sérum, inkubace probíhala 30 minut v humidním boxu. V dalším kroku byla na

sklíčka nanese primární protilátka C4/98 s 1 % kozím sérem ředěná PBS v poměru 1:4000. Inkubace probíhala přes noc v humidním boxu při 4 °C. Následující den byly vzorky propláchnuty 2x 15 minut v PBS a následně k nim byla přidána biotinylovaná sekundární protilátka ředěná 1:200 v PBS. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny a poté následovalo promývání 2x 15 minut v PBS. Během promývání vzorků byl připraven ABC kit smícháním 20 µl komponentu A, 20 µl komponentu B a 1960 µl PBS. Po vyjmutí z PBS se sklíčka s ABC kitem inkubovala 1 hodinu v humidním boxu. Následovalo promývání 2x 15 minut v PBS. Poté byl na vzorky v digestoři nanesen DAB rozpuštěný v 2,5 ml vody. Inkubace probíhala 2 minuty a poté byly vzorky omyty pod tekoucí vodou. Obarvené vzorky byly opět dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (50% ethanol → 75% ethanol → 96% ethanol) v každém roztoku po dobu 30 s, usušeny v termostatu při 37 °C a zamontovány. Snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu OlympusBX53 záznamovým zařízením DP74 při zvětšení 200x.

Přístroje a materiál	
Inkubační humidní box	
Třepačka WT12	Biometra, Německo
OlympusBX53	Olympus, Japonsko

Roztoky	
xylén	Penta, ČR
96% ethanol	Penta, ČR
75% etanol	Penta, ČR
50% etanol	Penta, ČR
30% H ₂ O ₂	Penta, ČR
100% metanol	Penta, ČR
PBS (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ *12*H ₂ O; pH=7,3)	Merck KGaA, Německo
citrátový pufr (pH=6)	Merck KGaA, Německo
Tween 0,05%	Serva, Německo
kozí sérum	Vector, USA

primární protilátka C4/98 proti myšimu proteinu vyvinutá v králíkovi	připravena v naší laboratoři (viz také Teodoro et al. 2014)
sekundární protilátka proti králíčím IgG, biotinylovaná	Vector, USA
ABC kit	Vector, USA
DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety	Merck KGaA, Německo
montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium)	Merck KGaA, Německo

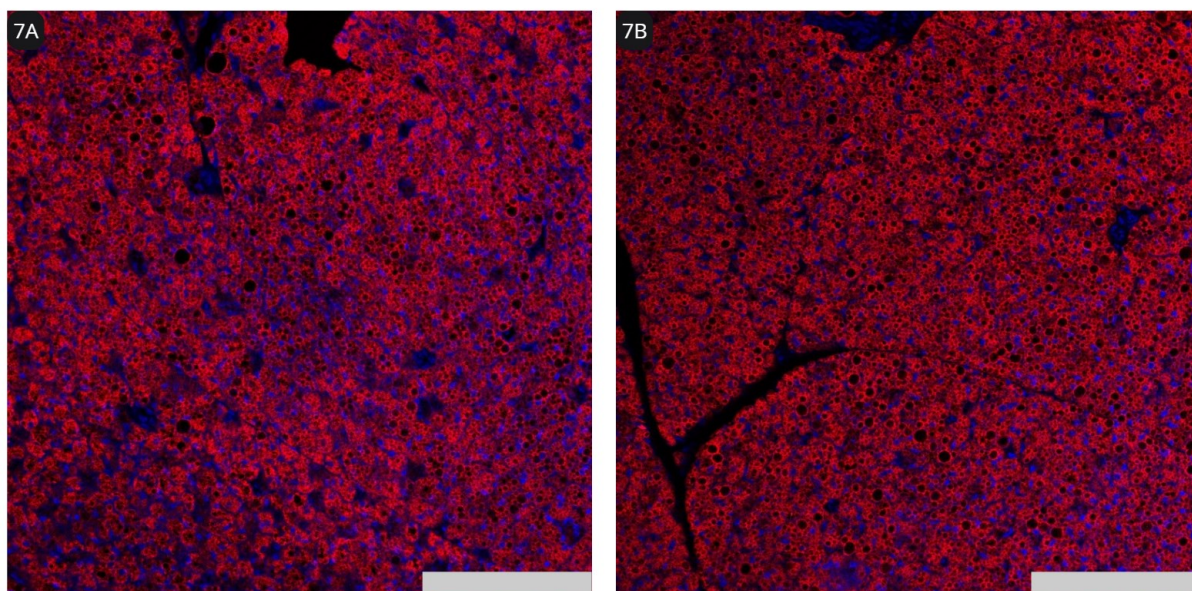
3.2.3. Imunochemické fluorescenční barvení

Fluorescence je fyzikální jev, kdy je systémem absorbován foton a následně emitováno světlo o delší vlnové délce. Některé látky jsou fluorescence schopné sami o sobě, pak mluvíme o autofluorescenci. Pro imunohistochemické fluorescenční barvení zde byla využita fluorescenční sonda. Jedná se o fluorochrom konjugovaný se sekundární protilátkou pro specifikaci cílové struktury.

Fluorescenční barvení perilipinu

Řezy byly nejprve deparafinovány a hydratovány v sestupné alkoholové řadě (2x xylen 15 minut → 2x 96% etanol 10 minut → 75% etanol 10 minut → 50% etanol 10 minut → oplach v destilované vodě). Poté se vzorky inkubovaly 20 minut při 95 °C v citrátovém pufru. Po zchladnutí kyvet (přibližně 20 minut) následovalo promytí v PBS 2x 15 minut a následně se 30 minut se inkubovaly v 3 % H₂O₂ v metanolu pro zablokování endogenní funkce peroxidázy. Vzorky byly opět promyty 2x 15 minut v PBS a následně bylo na vzorky naneseno oslí sérum naředěno 1:50 v PBS pro blokaci nespecifické vazby. Vzorky se inkubovali po dobu 30 minut v humidním boxu a poté byla na sklíčka nanesena primární protilátka proti perilipinu naředěná 1:200 s 1 % oslího séra. Inkubace probíhala přes noc v humidním boxu při 4 °C. Následující den byly vzorky promyty 2x 15 minut v PBS a následně inkubovány se sekundární protilátkou po dobu 2 hodiny v humidním boxu. Tento a následující kroky probíhaly ve tmě, aby se zamezilo ztrátě fluorescence. Po inkubaci byly vzorky promývány 2x 15 minut v PBS a zamontovány do vodního média. Snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8, před pořizováním snímků byly vzorky uchovávány ve tmě ve 4 °C. Snímky byly pořizovány při zvětšení 600x.

Tato metoda byla určena k přesnému vyhodnocení a porovnání velikosti tukových kapének v termoneutrální teplotě. Z důvodu velmi malých tukových kapének, a to i při velkém zvětšení, vzorky nemohly být kvantifikovány a ve výsledcích se o této metodě nadále nezmiňuji.



Obr č. 7. Ilustrativní fotografie barvení perilipinu (červená), BAT myši aklimatizovaných na 30 °C; 7A- kmen B6, HF dieta; 8B- kmen AJ HF dieta; 600x zvětšení, měřítko 100µm. Modře jsou obarvena jádra.

Přístroje a materiál	
Inkubační humidní box	
Třepačka WT12	Biometra, Německo
Mikroskop Leica TCS SP8	Leica microsystems, Německo

Roztoky	
xylén	Penta, ČR
96% ethanol	Penta, ČR
75% ethanol	Penta, ČR
50% ethanol	Penta, ČR
30% H ₂ O ₂	Penta, ČR
100% metanol	Penta, ČR

PBS (PBS (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ *12*H ₂ O; pH=7,2)	Merck KGaA, Německo
citrátový pufr (pH=6)	Merck KGaA, Německo
Oslí sérum	Merck KGaA, Německo
primární protilátka ab61682 pro C-terminální konec	Abcam, Velká Británie
sekundární protilátka Alexa 633 proti kozímu proteinu vyrobena v oslovi	Fischer Scientific, USA
montovací vodné médium antifade vectashield s DAB	Vector laboratories, USA

3.3. Analýza genové exprese

3.3.1. Izolace RNA

Samotná izolace probíhala při pokojové teplotě na speciálním místě laboratoře určené výhradně k izolaci RNA za pomoci pipet vyčleněných výhradně pro RNA izolaci, aby se předešlo kontaminaci. Zmrzlá tkáň se po vyjmutí z tekutého dusíku ponořila do mikrozkušavky s 1 ml TRIzolu (roztok obsahující guanidiniumthiokyanát a fenol) a pomoci keramické kuličky byla homogenizována v oscilačním mlýnu MM400 po dobu 3 minut. Následně byly vzorky centrifugovány (10 minut, 12000 g, 4 °C) a byla odebrána mezifáze, která obsahuje RNA. K odebrané mezifázi bylo do mikrozkušavky napipetováno 0,2 ml chloroformu. Tato směs byla důkladně zvortexována, inkubována 10 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována (15 minut, 14000 g, 4 °C) pro oddělení fází. Do nové 1,5 ml mikrozkušavky byla odebrána horní vodná fáze obsahující RNA a k ní napipetováno 0,5 ml izopropanolu. Směs byla promíchána a 10 minut inkubována při pokojové teplotě, aby došlo k vysrážení RNA. Poté byla směs centrifugována (10 minut, 12000 g, 4 °C) a výsledkem byla vysrážená RNA ve formě gelovitého peletu. Supernatant byl ze zkumavky odebrán a pelet byl promyt 1 ml 70 % etanolu. Zkumavka byla zvortexována a následně zcentrifugována (10 minut, 12000 g, 4 °C). Takto byl vzorek promyt 3x. Po promytí a odsátí supernatantu následovalo sušení na vakuové odparce (4-5 minut dle potřeby, 40 °C). Čistá RNA byla znovu rozpuštěna v 30 µl autoklávované superdestilované vody (15 minut, 60 °C) za občasného promíchávání. Na spektrofotometru NanoDrop byla zjištěna koncentrace a čistota vyizolované RNA, přičemž z hodnoty absorbance při 260 nm byla vypočtena koncentrace, poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm vypovídá o kontaminaci proteiny a poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 nm poukazuje na zbytky organických rozpouštědel. Obecně se doporučená hodnota má pohybovat v rozmezí 1,8-2,2, čehož bylo

dosaženo. Naředěná RNA známé koncentrace byla skladována při teplotě -80 °C do dalšího využití.

Přístroje a materiál	
pipety	Gilson, Francie
oscilační mlýn Mill MM400	Retsch, Německo
centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
minicentrifuga	Labnet, USA
vortex	Scientific Industries, USA
vakuová sušička VR-1 Heto	Thermo Scientific, USA
termoblok	Biometra, Německo
spektrofotometr NanoDrop	NanoDrop, USA

Roztoky	
TRIzol	Merck KGaA, Německo
chloroform	Penta, ČR
izopropanol	Serva, Německo
70% etanol	Penta, ČR

3.3.2. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu RNA na cDNA za pomoci reverzní transkriptázy. Používá se z důvodu, že DNA je mnohem stabilnější molekula. Práce s RNA probíhala na ledu, aby se zabránilo její degradaci. Po rozmražení byly vzorky RNA naředěny na koncentraci 1000 ng/μl, pokud to nebylo vzhledem k nízké koncentraci RNA možné, byla naředěna na koncentraci odpovídající 500 ng/μl, v ojedinělém případě pak na 100 ng/μl. Do reakce bylo poté odebíráno množství, které odpovídá 1000 ng RNA ve vzorku. Po naředění RNA byl v UV boxu připraven naředěný oligoT (mix A). Na reakci jednoho vzorku připadá 10,5 μl autoklávované vody, 1 μl RNA o koncentraci 1000 ng/μl a 0,5 μl oligoT, který je komplementární k polyA řetězci mRNA. Vzorky byly promíchány, stočeny a vloženy do termocycleru, kde se inkubovaly po dobu 5 minut při 65 °C, došlo tak k rozrušení vlásenek RNA. V mezičase byl v UV boxu připraven mix na reverzní transkripci (mix B) smícháním 4 μl 5x koncentrovaného pufru pro reverzní transkripci, 2 μl DTT (dithiotreitolu),

1 μ l dNTP mixu a 1 μ l M-MLV reverzní transkriptázy na reakci jednoho vzorku. Po denaturaci byly vzorky zchlazeny na vychlazeném bločku a ke každému z nich bylo napipetováno příslušné množství mixu B. Vzorky byly vráceny do termocycleru, kde probíhala reakce po dobu 50 minut při 37 °C, ve které docházelo k syntéze komplementárního vlákna cDNA. V posledních 10 minutách následovalo zahřátí vzorku na 72 °C pro denaturaci a následné rychlé ochlazení na 4 °C. Takto získaná cDNA byla naředěna 20x a ponechána v - 20 °C pro další použití.

Přístroje a materiál	
pipety	Gilson, Francie
vortex	Scientific Industries, USA
minicentrifuga	Labnet, USA
termocycler	Biometra, Německo

Roztoky	
oligo T	Generi Biotech, ČR
5x konc. pufr pro reverzní transkripci	Invitrogen, Německo
dNTP	Invitrogen, Německo
DTT	Invitrogen, Německo
M-MLV reverzní transkriptáza	Invitrogen, Německo

3.3.3. Kvantitativní PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda využívaná na měření genové exprese. Na rozdíl od standardního PCR se při kvantitativním PCR (qPCR) zaznamenává množství produktu v každém cyklu. Funguje na principu fluorescence, která je přímo úměrná množství amplifikované DNA. Zde bylo k fluorescenci využito interkalační činidlo SYBR Green.

V UV boxu byl do sterilní 1,5 ml mikrozkuhavky připraven PCR mix za použití 5 μ l 2x koncentrovaného pufru obsahující SYBR Green, 3 μ l redestilované vody, 0,5 μ l 3' primeru (naředěný 1:9) a 0,5 μ l 5' primeru (naředěný 1:9). Primery byly navrženy pomocí programu DNASTAR a následně byla ověřována specifita pomocí NCBI Blast. Připravený PCR mix byl následně rozpipetován do 384 jamkových destiček po 9 μ l a do každé jamky byl nanesen 1 μ l vzorku. Vzorky byly nanášeny v dubletech, včetně ředící řady (10x, 20x, 40x, 80x) pro

sestavení kalibrační přímky a negativní kontroly, kam byl místo vzorku pipetován 1 µl vody. Vzorky a destičky byly po celou dobu uchovávány na chladících bločcích. Poté byla destička vložena do přístroje LightCycler® 480 System. Reakce je zahájena iniciací, kdy dochází k zahřátí směsi na 95 °C po dobu 30 s, a tím aktivaci DNA polymerázy a disociaci na jednovláknovou DNA. Při denaturaci v každém dalším cyklu byla teplota 95 °C udržována po dobu 10 s. Následuje pokles teploty udržované po dobu 20 s, kdy dochází k nasedání primerů (teplota se liší pro jednotlivé primery viz Tabulka č. 2.) na jednovláknovou DNA. Po nasednutí se teplota zvýší na 72 °C, udržována 20 s, a započne syntéza podle templátové DNA ve směru 5' → 3'. Reakce proběhla ve 45 cyklech a na konci každého cyklu byla přístrojem změřena fluorescence. Po ukončení posledního cyklu se teplota opět zvýšila na 98 °C, čímž došlo k rozpadu dsDNA a tím k uvolnění interkalačního barviva a poklesu fluorescence. Pro určení specificity použitého primeru a potvrzení vzniku požadovaného produktu byla použita denaturační analýza. Tato metoda umožnila sledování změn v absorpčním spektru vzorku během tavné křivky (T_m), což je teplota, při které dojde k denaturaci dvouvláknového PCR produktu. Tato analýza byla klíčová pro potvrzení, že amplifikovaný produkt odpovídá požadované velikosti a sekvenci, čímž byla zajištěna vysoká specifita primerů. Na základě těchto výsledků bylo možné vyloučit přítomnost nespecifických produktů, což by mohlo ovlivnit výsledky experimentu.

Pro kvantifikaci genové exprese byl ze všech vzorků připraven směsný vzorek, ze kterého byla vytvořena ředící řada viz výše. Ředící řada byla využita k tvorbě kalibrační křivky pro stanovení množství produktu ve vzorcích, data z dubletů byla zprůměrována. Hodnoty exprese cílových genů byly vztaženy na geometrické průměry referenčních genů, pomocí $\Delta\Delta C_p$ metody, které by se v rámci vzorků neměly svou expresí signifikantně lišit. Z důvodu velké variability vzorků (vliv genotypu, teploty, diety) nebyl nalezen referenční gen, ani geometrický průměr referenčních genů pro všechny vzorky. Vzorky byly tedy rozřazeny do modelů 1-7. Pro každý model byl nalezen referenční gen, podle kterého byla data normalizována (viz Tabulka č. 3; kapitola 3.4. Statistická analýza). Seznam použitých referenčních genů viz Tabulka č.2.

Gen	Kód GenBank	Sekvence	Délka produktu (bp)	Teplota nasedání (°C)
<i>Acadl</i>	11363	5' TGGCATCAACATCGCAGAGAAACA 3' ACCGATACACTTGCCCGCCGTCAT	208	59,2
<i>Acly</i>	104112	5'GTGGCGGGGAAGTGCTGTTTGA	266	61,2

		3' TGTGCTCGGGCTGGGAAGGAC		
<i>B2m</i> – Ref.	12010	5' AATTGAAGTCTGTCACTGTGCCCAA 3' ACAAAGCAGAAGTAGCCACAGGGT	72	52,9
<i>Cd36</i>	12491	5' TGATACTATGCCCGCCTCTCC 3' TTCCCACACTCCTTTCTCCTCTAC	143	54,9
<i>Cidea</i>	12683	5' ACTGGCCTGGTTACGCTGGTG 3' GGCTATTCCCGATTCTTTGGTTG	174	58,1
<i>Dgat1</i>	13350	5' TGGCCAGGACAGGAGTATTTTGA 3' CTCGGGCATCGTAGTTGAGCA	249	59,6
<i>Dgat2</i>	67800	5' CCAGCCCCAGGTGTCAGAGGAG 3' GGGGCCGACGGGTCCAGAAGAAG	99	60,1
<i>Eef1a1</i> - Ref.	13627	5' TGACAGCAAAAACGACCCACCAAT 3' GGGCCATCTTCCAGCTTCTTACCA	192	58,6
<i>Fasn</i>	14104	5' TGG GTG TGG AAG TTC GTC AG 3' GTC GTG TCA GTA GCC GAG TC	130	60
<i>Gapdh</i> – Ref.	14433	5' CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT 3' CTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC	162	60,5
<i>Gk</i>	14933	5' TCGTTCCAGCATTTTCAGGGTTAT 3' TCAGGCATGGAGGGTTTCACTACT	280	56,7
<i>Lpl</i>	16956	5' AGCCCCAGTCGCCTTTCTCCT 3' TGCTTTGCTGGGGTTTTCTTCATTCA	286	59,8
<i>Pck1</i>	18534	5' GGCAGCATGGGGTGTGTGTAGGA 3' TTTGCCGAAGTTGTAGCCGAAGAAG	248	60,5
<i>Pcx</i>	18563	5' CCCCTGGATAGCCTTAATACTCGT 3' TGGCCCTTCACATCCTTCAAA	248	58,2
<i>Plin5</i>	66968	5' AATGGCCGCAGCCACAGTGAG 3' GGTGCCACATCACCAAGGCAG	209	61,7
<i>Pnpla2</i>	66853	5' GGCAATCAGCAGGCAGGGTCTTTA 3' GCCAACGCCACTCACATCTACG	248	60,6
<i>Ppib</i> – Ref.	19035	5' AGGGGAGATGGCACAGGAGGAAAGAGC 3' ACCCAGCCAGGCCCGTAGTGC	89	58,3
<i>Rplp0</i> - Ref.	11837	5' CCGCAGGGGCAGCAGTGGTG 3' AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	136	60,1
<i>Ucp1</i>	22227	5' CACGGGGACCTACAATGCTTACAG 3' GGCCGTCGGTCCTTCCTT	337	57,5
<i>Ywhaz</i> - Ref.	22631	5' CCTCGGCCAAGTAACGGTAGT 3' CGGAGCTGCGTGACATCTG	132	54,5

Tabulka č. 2. Údaje k použitým primerům; Ref. – referenční gen

Přístroje a materiál:	
pipety, multikanálová pipeta	Gilson, Francie
vortex	Scientific Industries, USA
minicentrifuga	Labnet, USA
LightCycler® 480 Real-time PCR System	Roche, Německo

Roztoky	
Primery, konc. 40nm	Generi Biotech, ČR
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Německo

3.4. Statistická analýza

Pro statistické zpracování dat byl použit program GraphPad Prism. Pro porovnání změny exprese genů v rámci modelů 1-4 byla použita jednocestná ANOVA. Pro porovnání genové exprese modelů 5-7 byla použita dvoucestná ANOVA. Pokud data neměla normální rozložení, byl na ně aplikován neparametrický Kruskal-Wallisův test. Všechny výsledky jsou prezentovány jako průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE).

Číslo modelu	Specifikace modelu	použité referenční geny
1	myši kmene AJ na ST dietě	geometrický průměr genů <i>Ppib</i> a <i>B2m</i>
2	myši kmene AJ na HF dietě	geometrický průměr genů <i>Rplp0</i> a <i>B2m</i>
3	myši kmene B6 na ST dietě	<i>Rplp0</i>
4	myši kmene B6 na HF dietě	geometrický průměr genů <i>Gapdh</i> a <i>B2m</i>
5	myši aklimatizované na 30 °C	geometrický průměr genů <i>Ppib</i> a <i>Ywhaz</i>
6	myši aklimatizované na 22 °C	geometrický průměr genů <i>Eef1a1</i> a <i>Rplp0</i>
7	myši aklimatizované na 8 °C	geometrický průměr genů <i>Eef1a1</i> a <i>Rplp0</i>

Tabulka č.3. Seznam použitých referenčních genů

4. Výsledky

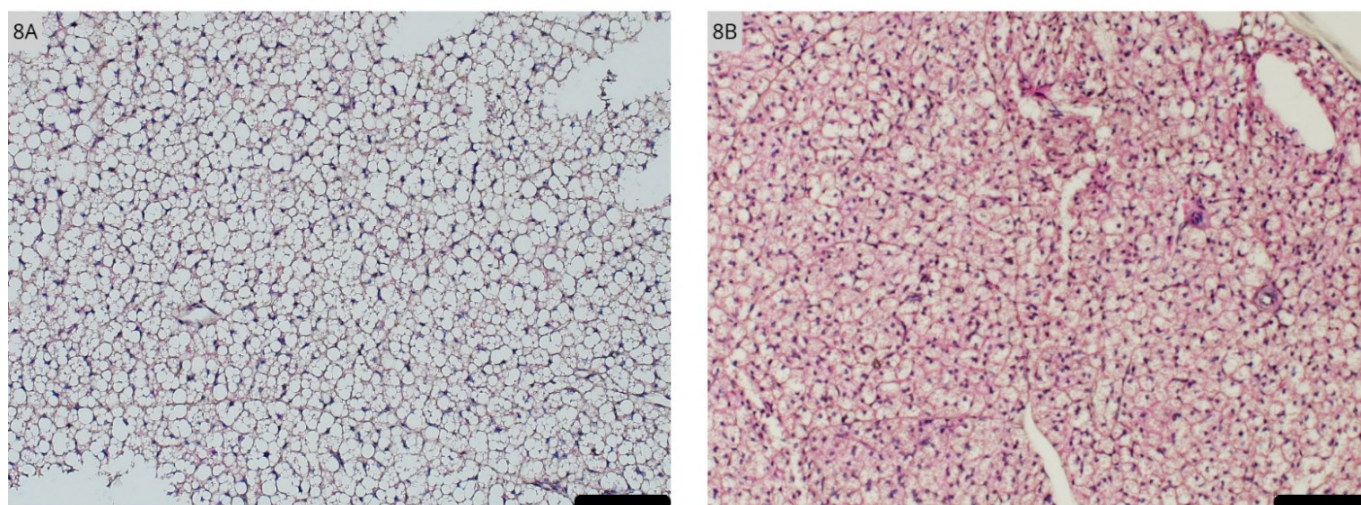
4.1. Velikost tukových kapének v adipocytech

Velikost tukových kapének byla porovnávána pomocí histologické analýzy barvením hematoxylinem a eosinem. Pro prezentaci výsledků byl z každé skupiny vybrán jeden

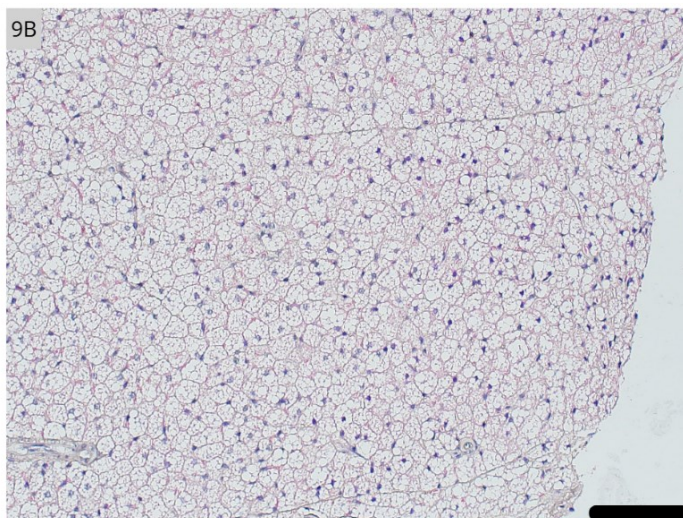
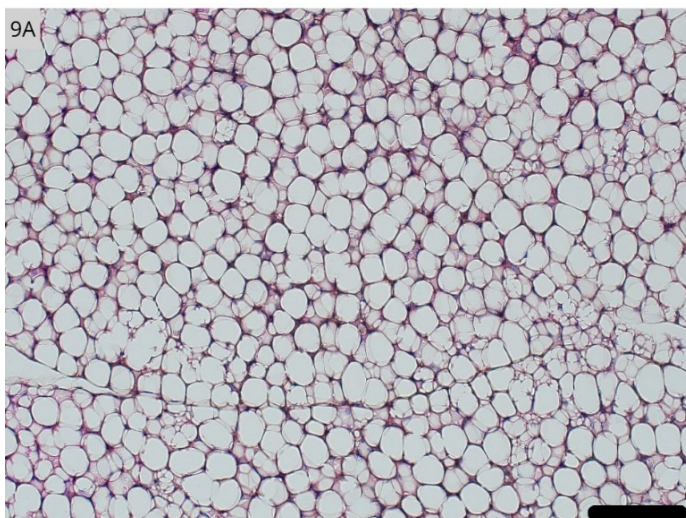
reprezentativní vzorek, který nejvíce odpovídal obvyklé distribuci a velikosti tukových kapének v každé skupině. U kmene AJ vidíme aktivovaný lipidový metabolismus v BAT při nižších teplotách (Obr. 10A, 12A), tj výskyt velmi malých tukových kapének, v porovnání s BAT myši aklimatizovaných na termoneutrální teplotu (Obr. 8A). Po aklimatizaci na mírný chlad (22 °C) ani chlad (8 °C) nelze odlišit vliv HF diety (Obr 10A-B, 12A-B), kapénky jsou malé, což značí aktivní lipidový metabolismus (tvorba nových lipidových kapének). Vliv HF diety pozorujeme v termoneutrální teplotě (30 °C), kdy myši AJ krmené HF dietou mají ve srovnání se skupinou na ST dietě překvapivě menší průměr tukových kapének (Obr. 8A-8B). Vzhledem k tomu, že myši byly krmeny HF dietou pouze dva týdny, může tento výsledek naznačovat vyšší aktivaci tkáně, pravděpodobně kvůli její přestavbě. U myšího kmene AJ na ST dietě pozorujeme postupnou změnu ve velikosti tukových kapének ve směru teploty 30 → 8 °C (Obr. 8A, 10A, 12A)

U kmene B6 největší změny ve velikosti tukových kapének v BAT pozorujeme při přechodu z termoneutrální teploty do mírného chladu. Dochází tu k viditelné změně velikosti tukových kapének mezi teplotami 30 °C a 22 °C (Obr. 9A, 11A). Myši krmené ST dietou vykazují minimální změny ve velikostech kapének mezi 8 °C a 22 °C (Obr. 11A, 13A). U B6 myši krmených HF dietou (Obr. 13B) pozorujeme ve srovnání s AJ kmenem krmeným HF dietou (Obr. 12B) i B6 myšmi krmenými ST dietou při 8 °C (Obr. 13A) zvětšené tukové kapénky, místy až unilokulárního fenotypu a více heterogenní tkáň. Podobně jako u myšího kmene AJ pozorujeme vliv HF diety při termoneutrální teplotě (9A, 9B), kdy dochází ke zmenšení lipidových kapének při konzumaci HF diety. Při srovnání AJ (Obr. 8A) a B6 (Obr. 9A) ve 30 °C na ST dietě zjistíme, že tukové kapénky kmene B6 jsou větší.

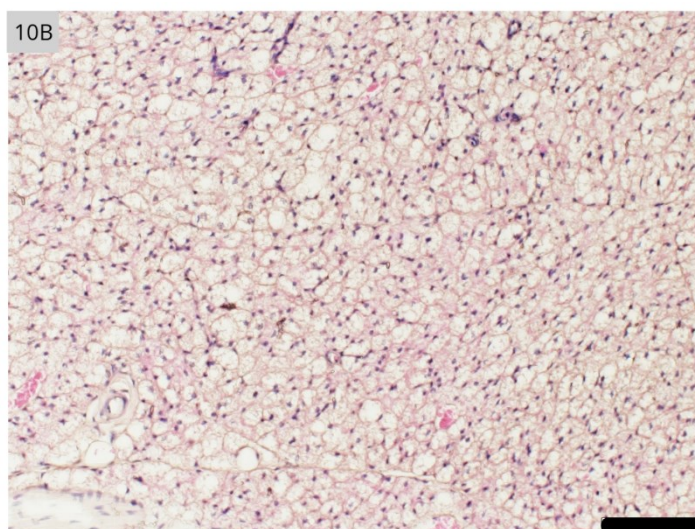
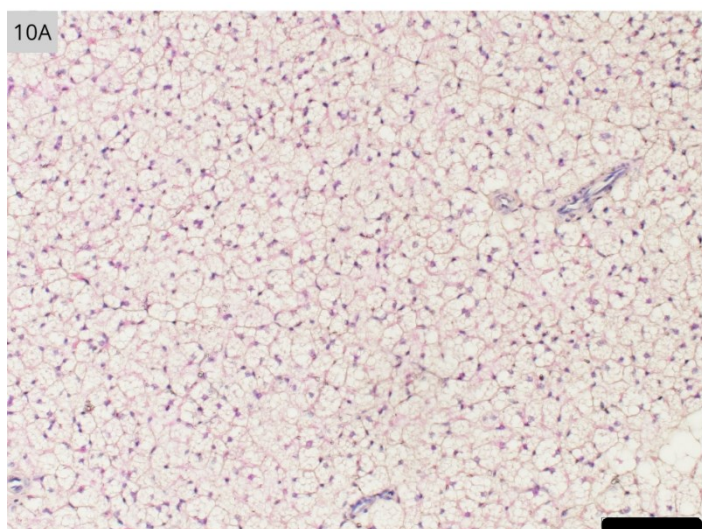
Sloupec A – BAT myši krmených ST dietou, Sloupec B – BAT myši krmených HF dietou.



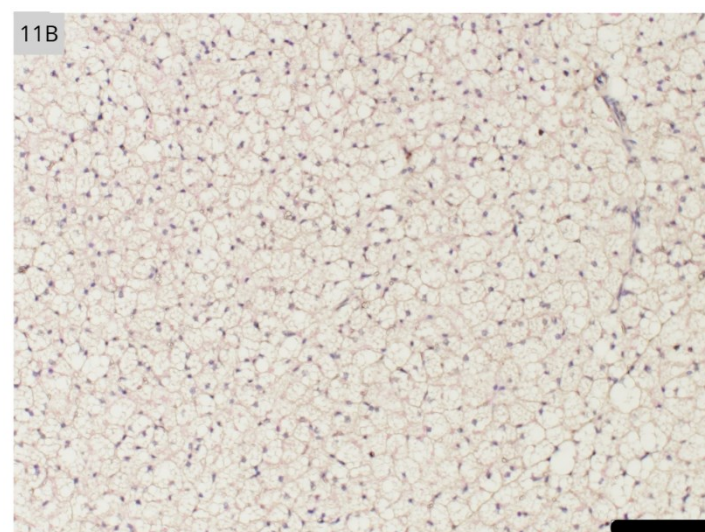
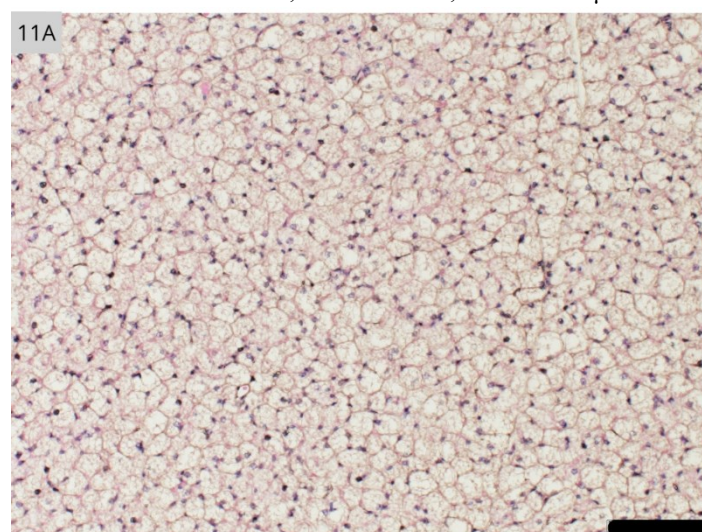
Obr. č. 8. Velikost tukových kapének v BAT myšího kmene AJ aklimatizovaného na 30 °C; 8A – ST dieta, 8B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100µm.



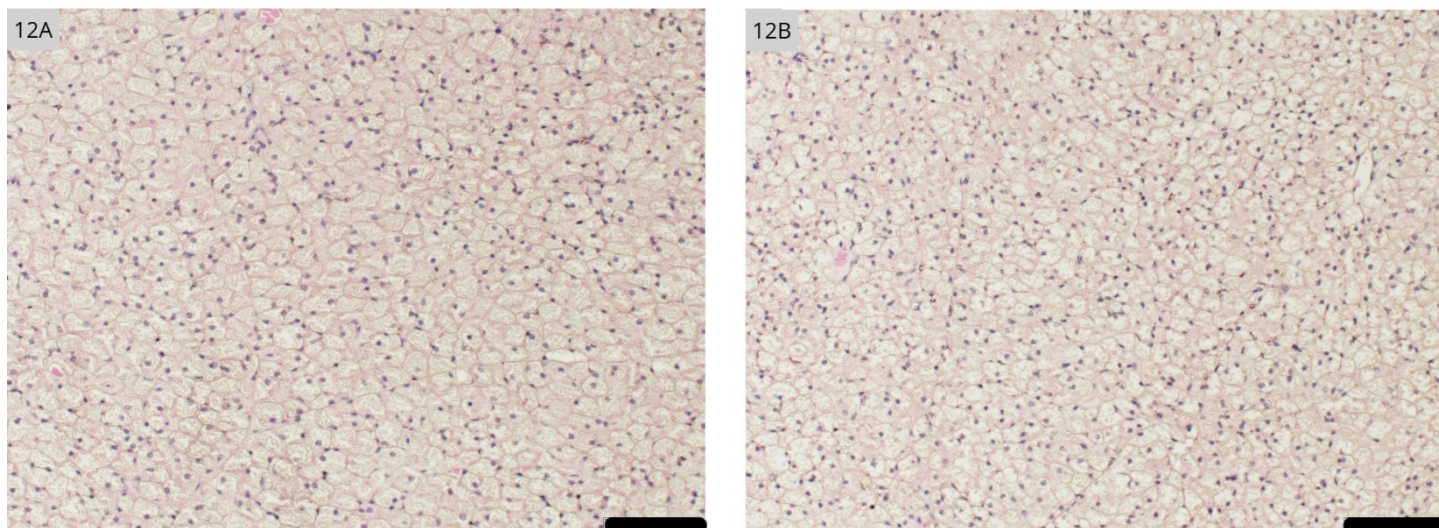
Obr. č. 9. Velikost tukových kapének v BAT myšiho kmene B6 aklimatizovaného na 30 °C; 9A – ST dieta, 9B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100μm.



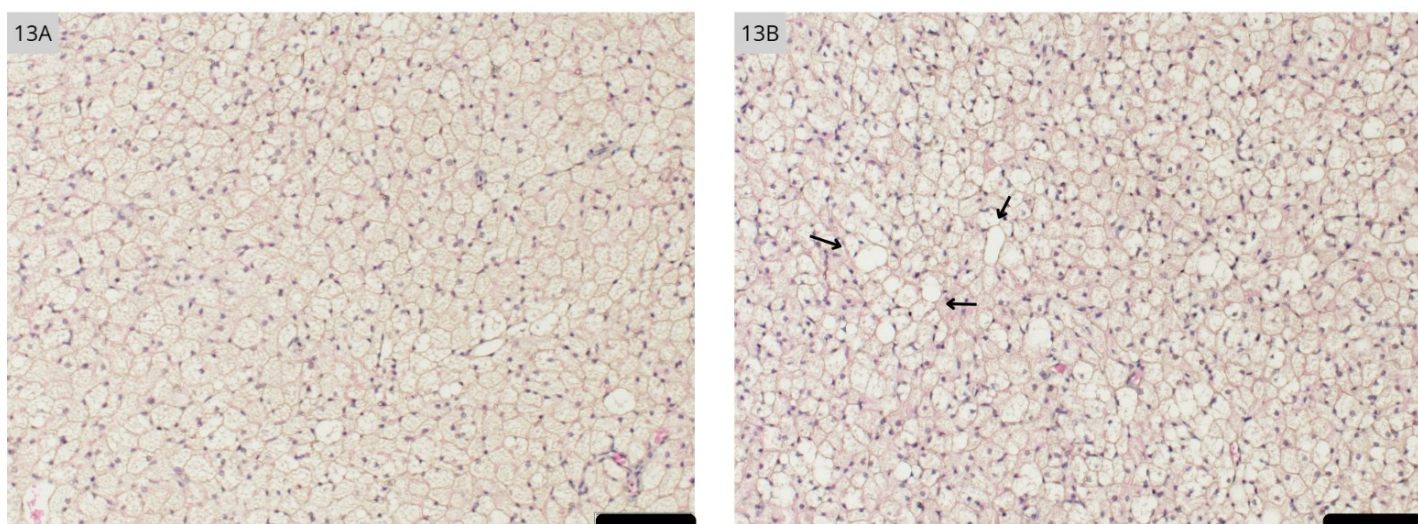
Obr. č. 10. Velikost tukových kapének v BAT myšiho kmene AJ aklimatizovaného na 22 °C; 10A – ST dieta, 10B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100μm.



Obr. č. 11. Velikost tukových kapének v BAT myšiho kmene B6 aklimatizovaného na 22 °C; 11A – ST dieta, 11B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100μm.



Obr. č. 12. Velikost tukových kapének v BAT myšiho kmene AJ aklimatizovaného na 8 °C; 12A – ST dieta, 12B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100μm



Obr. č. 13. Velikost tukových kapének v BAT myšiho kmene B6 aklimatizovaného na 8 °C; 13A – ST dieta, 13B – HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100μm. Šipky poukazují na příklady unilokulárního fenotypu zmiňovaného v textu.

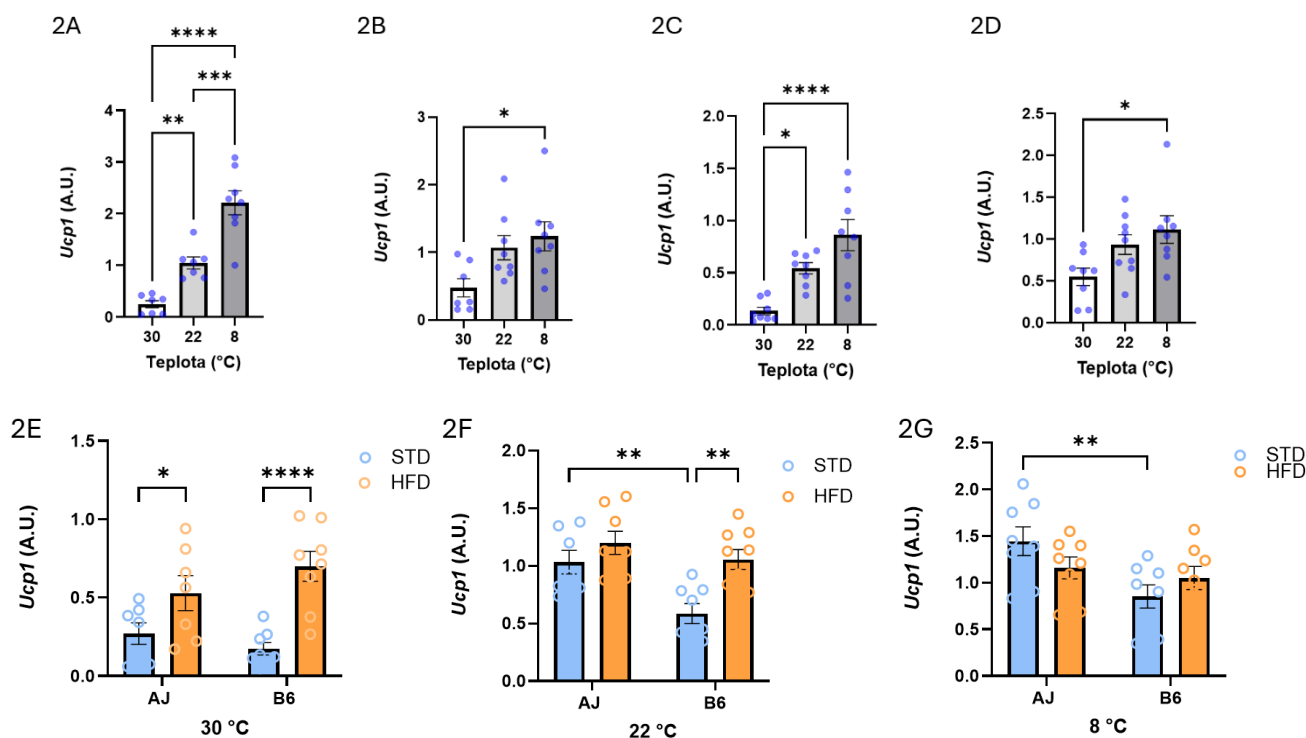
4.2. Expresa *Ucp1*

Množství UCP1 je spojováno s mírou NST a aktivací BAT, avšak zvýšená exprese genu nutně neznamená zvýšenou tvorbu tohoto proteinu ani jeho aktivaci.

Expresa *Ucp1* se zvyšuje s klesající teplotou, a to napříč genotypem i druhem diety (Graf 2A-2D). Přesto je vliv diety a genotypu na množství exprese patrný. HF dieta potlačila nárůst exprese u obou kmenů chovaných v teplotách 22 °C a 8 °C (Graf 2B, 2D), které bylo pozorováno u myši krmených ST dietou. U myši na ST dietě vidíme rozdíl mezi genotypy, AJ mají na rozdíl od B6 významnější signifikanci v nárůstu exprese *Ucp1* (Graf 2A, 2C).

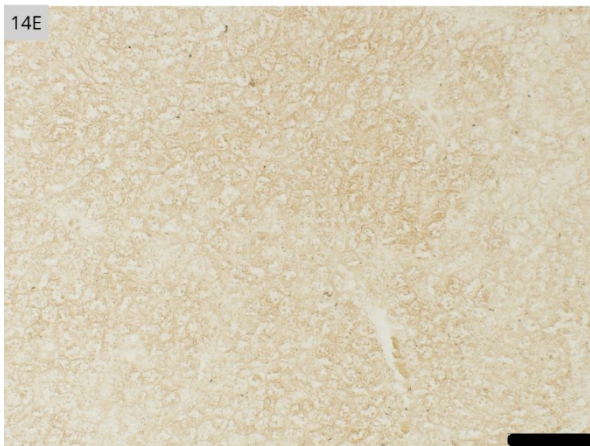
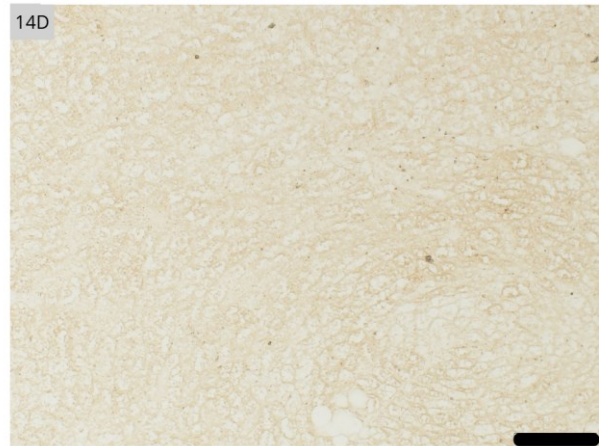
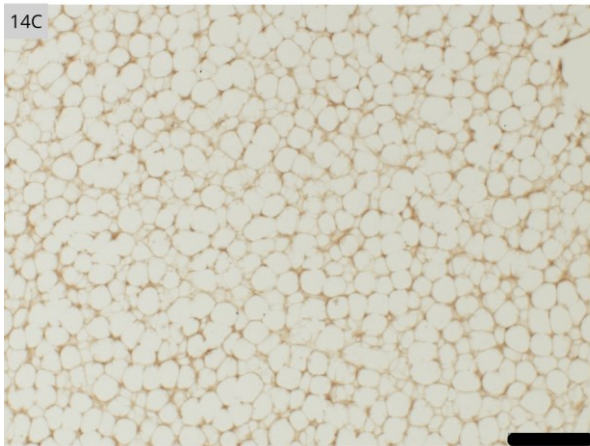
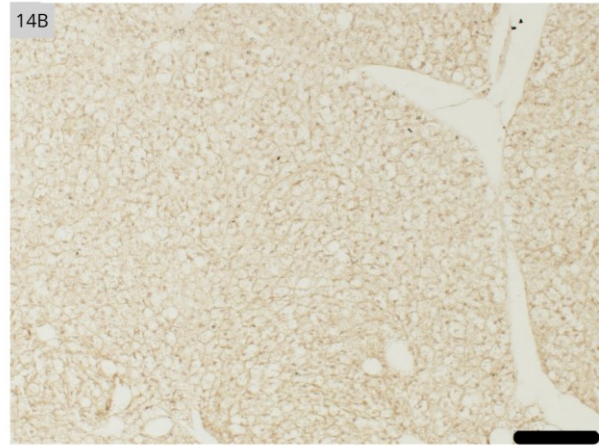
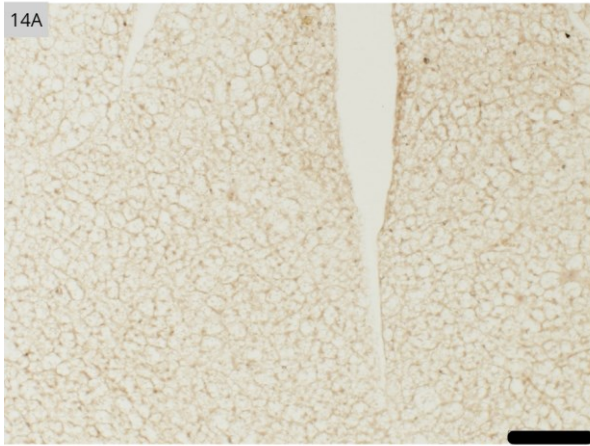
V termoneutralní teplotě pozorujeme vliv diety, kdy při krmení HF dietou došlo ke zvýšení exprese *Ucp1* u obou kmenů (Graf 2E). Při mírném chladu je patrný vliv diety i genotypu,

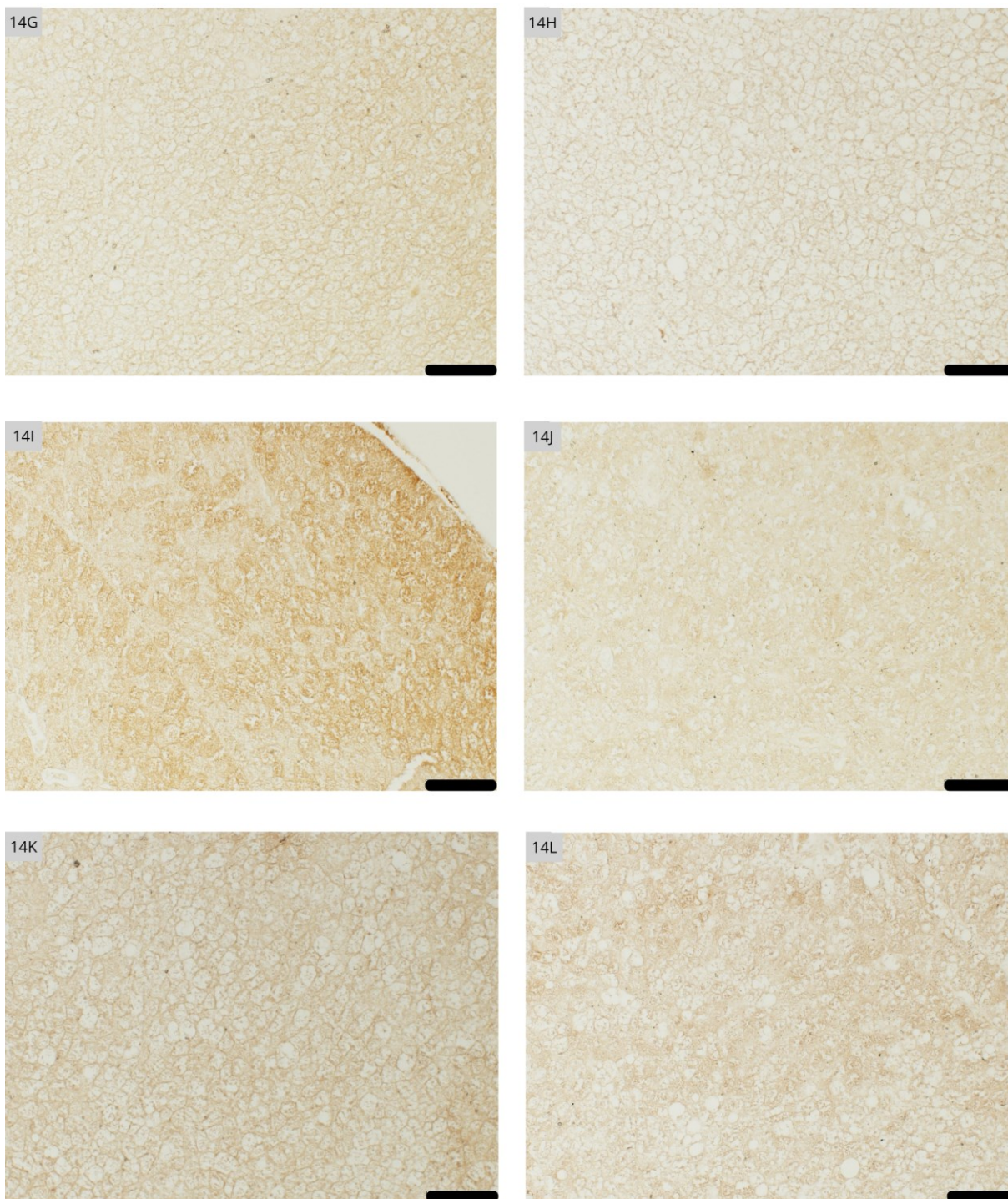
opět konzumace HF diety zvýšila expresi *Ucp1*, při srovnání kmenů vyšší expresi vykazuje kmen AJ (Graf 2F). U myši vystavených chladu se vliv diety již neprojevuje, exprese *Ucp1* se liší pouze v rámci genotypu (Graf 2G). Kmen AJ má v obou případech diety vyšší expresi *Ucp1*.



Grafy č. 2. Vztah mezi teplotou aklimatizace a mírou exprese *Ucp1* u jednotlivých modelů. 2A – model č. 1. AJ, ST dieta; 2B – model č. 2., AJ HF dieta; 2C – model č. 3. B6 ST dieta; 2D – model č. 4., B6 HF dieta. 2E – model č. 5. 30 °C; 2F – model č. 6, 22 °C; 2G – model č. 7., 8 °C; STD – standardní dieta, HFD – vysokotuková dieta; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

V rámci diplomové práce byl protein UCP1 barven histologicky (Obr. 14A-L), výsledky prokazují jeho vysoké množství v tkáni, ovšem jeho přesné množství z fotografií nelze vyhodnotit.





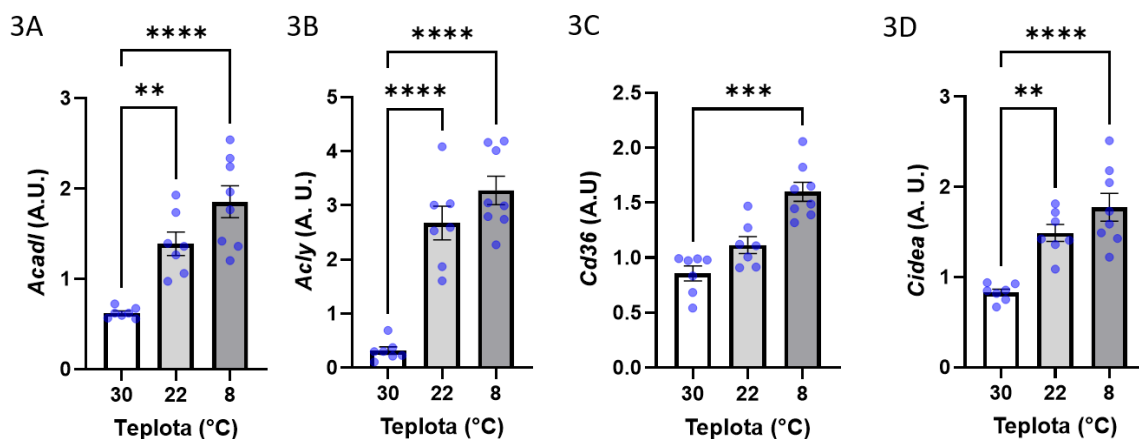
Obr. č. 14. Imunohistochemické barvení pro vizualizaci UCP1 (hnědá); 14A – kmen AJ, aklimatizovaný na 30 °C, ST dieta, 14B – kmen AJ, aklimatizovaný na 30 °C, HF dieta, 14C – kmen B6, aklimatizovaný na 30 °C, ST dieta, 14D – kmen B6, aklimatizovaný na 30 °C, HF dieta, 14E – kmen AJ, aklimatizovaný na 22 °C, ST dieta, 14F – kmen AJ, aklimatizovaný na 22 °C, HF dieta, 14G – kmen B6, aklimatizovaný na 22 °C, ST dieta, 14H – kmen B6, aklimatizovaný na 22 °C, HF dieta, 14I – kmen AJ, aklimatizovaný na 8 °C, ST dieta, 14J – kmen AJ, aklimatizovaný na 8 °C, HF dieta, 14K – kmen B6, aklimatizovaný na 8 °C, ST dieta, 14L – kmen B6, aklimatizovaný na 8 °C, HF dieta; 200x zvětšení, měřítko 100µm

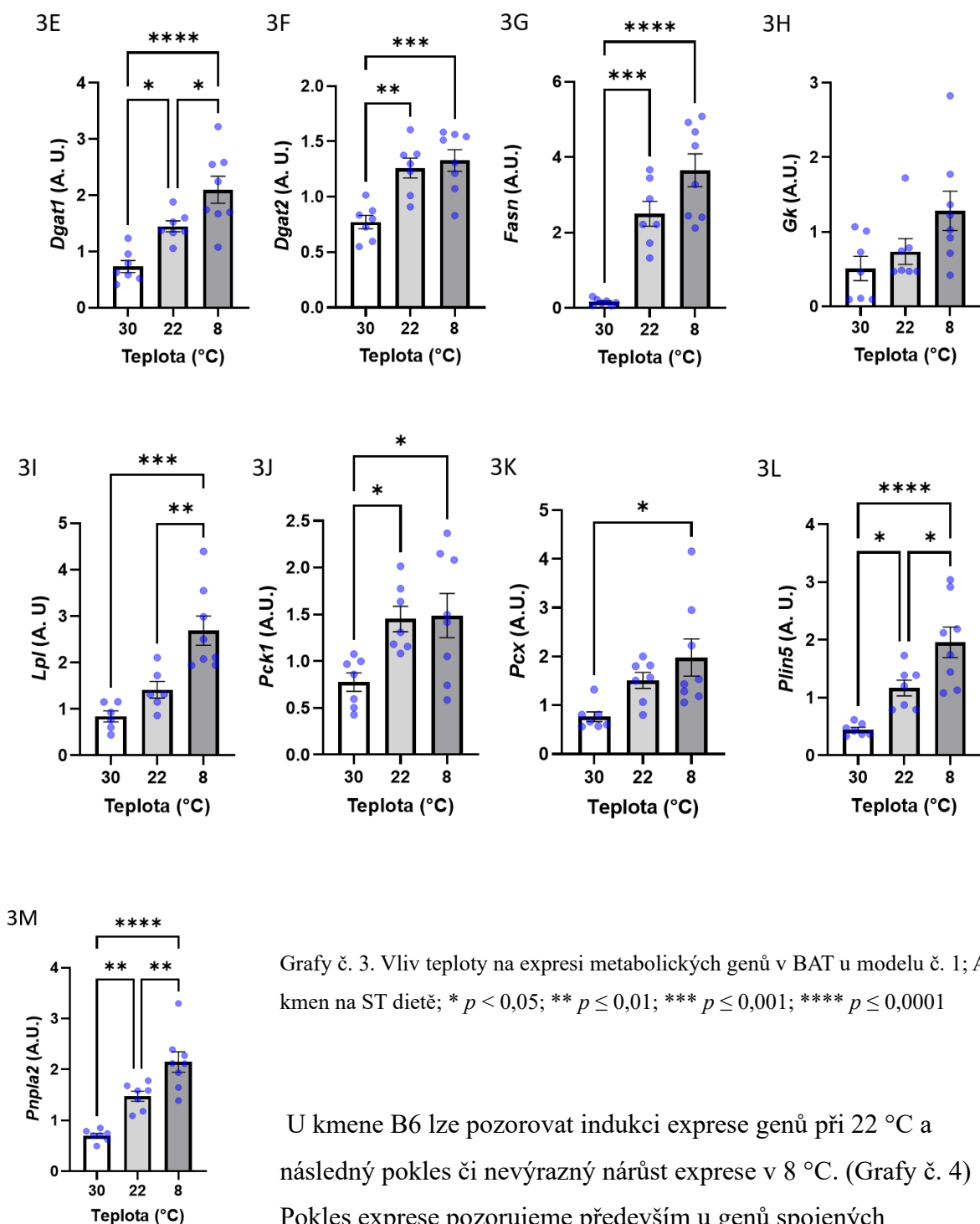
4.3. Vliv teploty na metabolismus BAT v rámci daného genotypu

U obou genotypů jsou teplotou ovlivněny všechny sledované dráhy, liší se pouze míra aktivace genové exprese.

U myšího kmene AJ lze pozorovat postupnou indukci exprese všech genů, kdy při 30 °C je nejnižší a při 8 °C nejvyšší (Grafy č. 3). Změny v expresi jsou signifikantní u všech sledovaných genů kromě *Gk* (Graf 3H), kde je pouze trendový nárůst. Z výsledků vyplývá, že chladová aklimatizace u kmene AJ podporuje zvýšení lipidového metabolismu. Dle signifikantně zvýšené exprese *Lpl* (Graf 3I), *Dgat1* (Graf 3E) a *Cidea* (Graf 3D) lze soudit zvýšený příjem MK do buňky, z těchto MK následnou tvorbu TAG a ukládání do tukových kapének. Dochází také k signifikantnímu zvýšení exprese *Pnpla2* (Graf 3M) a *Plin5* (Graf 3L), což by mohlo značit navýšenou lipolýzu a kontakt lipidové partikule s mitochondrii pro následnou β -oxidaci, exprese *Acadl* je také zvýšena (Graf 3A).

Expres *Dgat2* je také zvýšena, ovšem větší změnu v expresi pozorujeme mezi 30 °C a 22 °C (Graf 3F), lze tedy předpokládat, že při mírném chladu adipocyty BAT k lipidovému cyklování využívají spíše interní zásoby TAG na rozdíl od 8 °C chladu. S touto hypotézou jsou v souladu i exprese ostatních genů spojených se syntézou TAG z interních zdrojů buňky zvýšené především mezi 30 °C a 22 °C (*Acly* - Graf 3B, *Fasn* - Graf 3G, *Pck1* – Graf 3J).

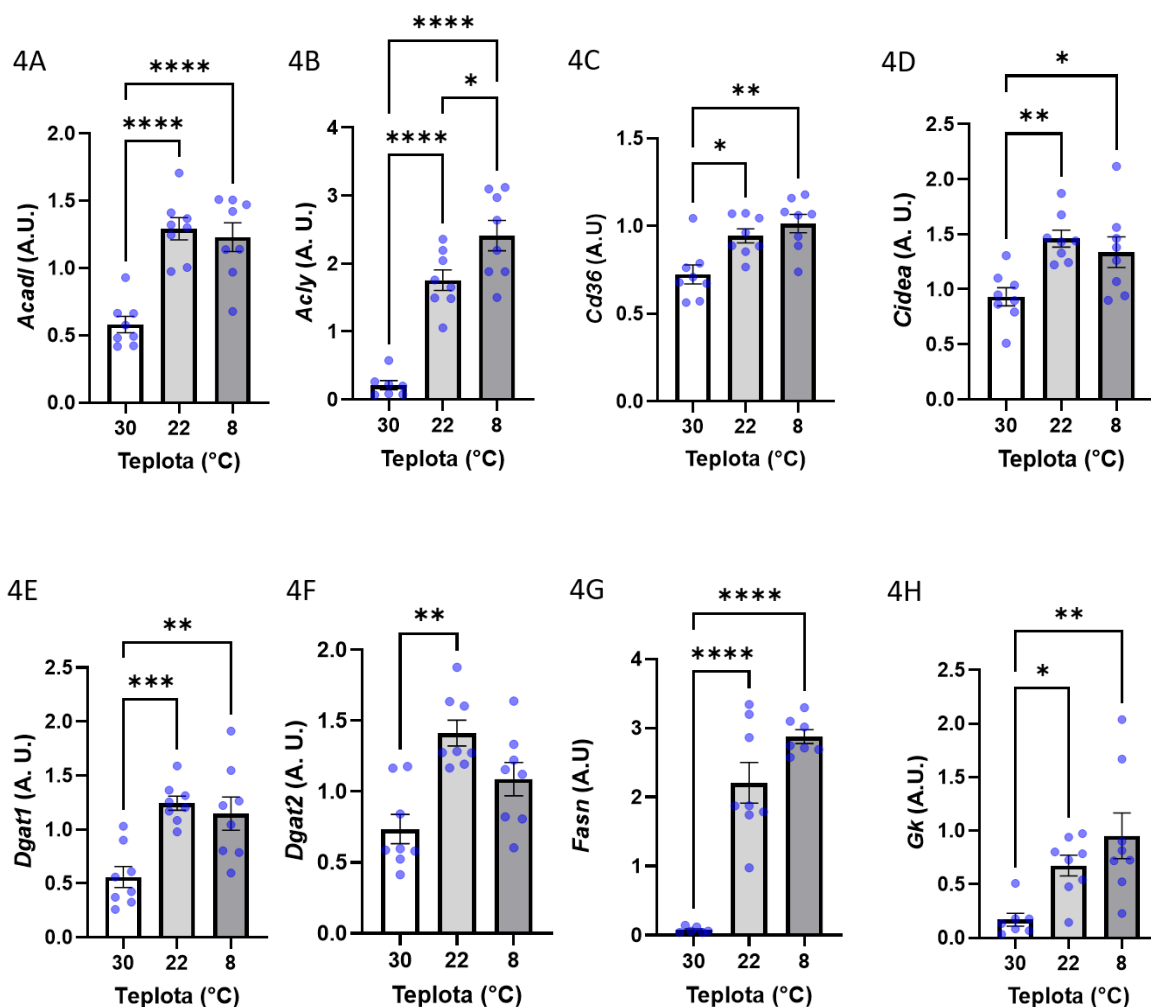


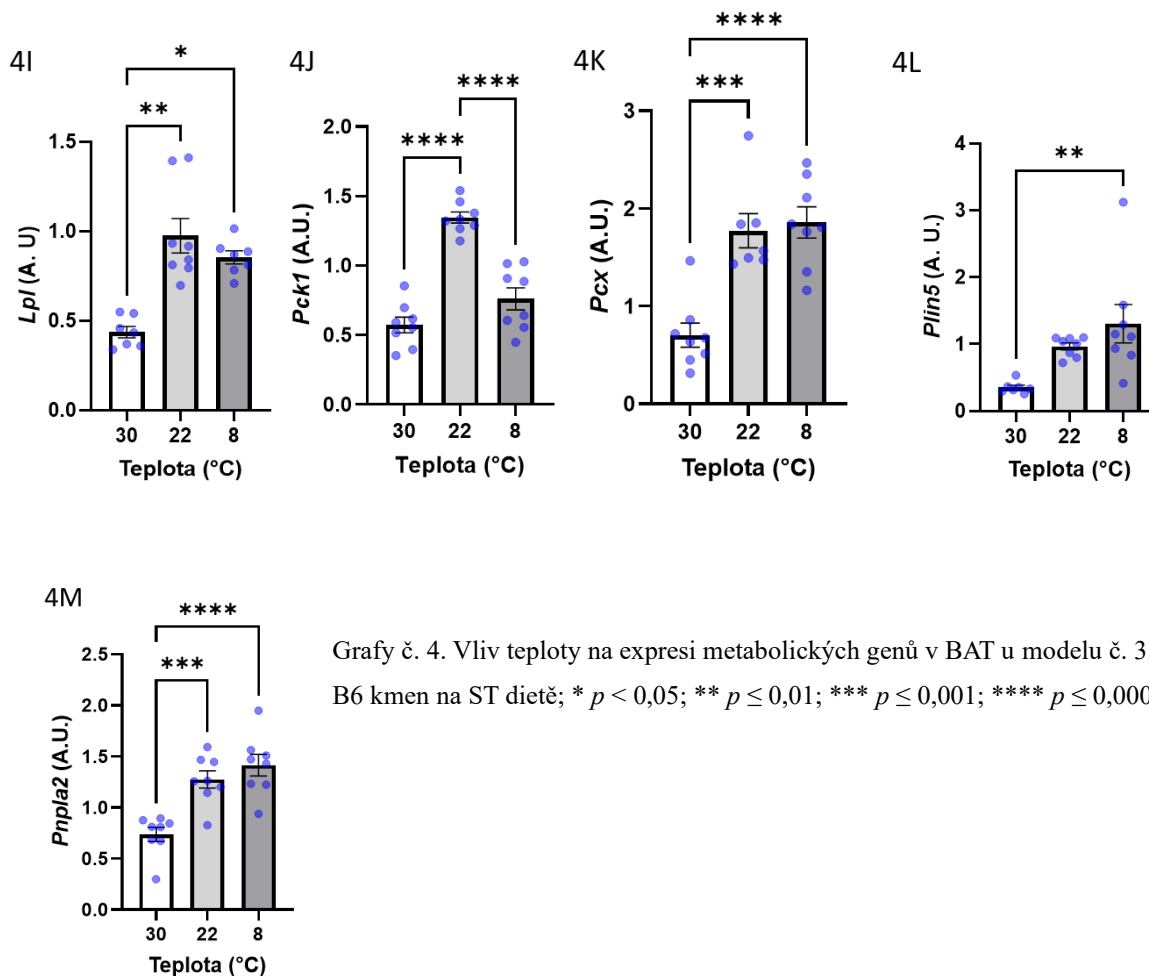


Grafy č. 3. Vliv teploty na expresi metabolických genů v BAT u modelu č. 1; AJ kmen na ST dietě; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

U kmene B6 lze pozorovat indukci exprese genů při 22 °C a následný pokles či nevýrazný nárůst exprese v 8 °C. (Grafy č. 4) Pokles exprese pozorujeme především u genů spojených s lipogenezí či příjmem MK do buňky (*Cidea* - Graf 4D, *Dgat1* - Graf 4E, *Dgat2* - Graf 4F, *Lpl* - Graf 4I, *Pck1* – Graf 4J), což by mohlo poukazovat na sníženou aktivitu dráhy lipogeneze. V kontrastu s těmito výsledky, je exprese *Achy*, jako jediného genu pro protein podílející se na lipogenezi, signifikantně zvýšena (Graf 4B), což by mohlo souviset se schopností ACLY zmírňovat mitochondriální stres v BAT a tím podporovat termogenezi (Korobkina et al. 2024). K poklesu exprese ve srovnání s 22 °C dochází i u genu spojeného s β -oxidací (*Acadl*, Graf 4A).

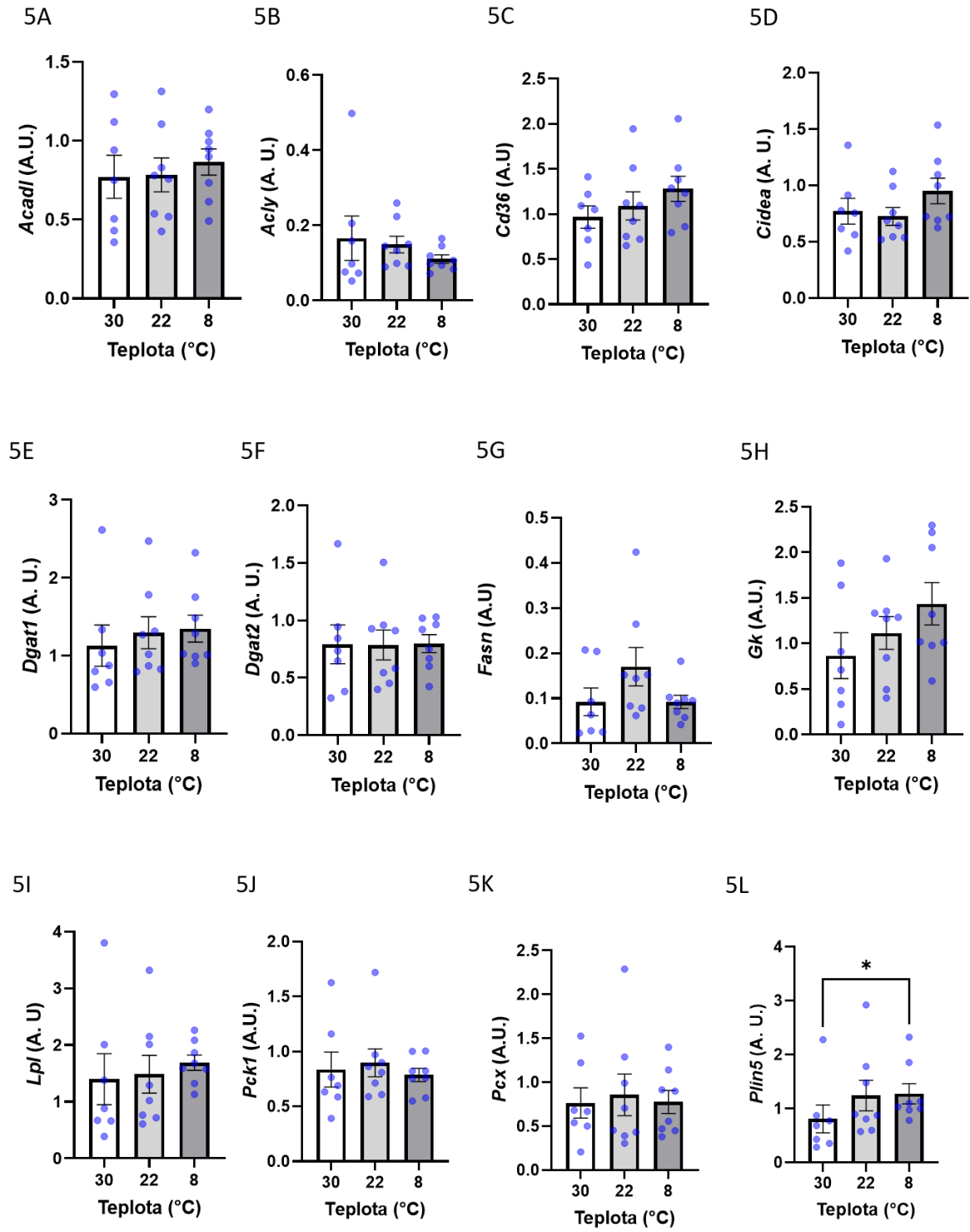
Z genové exprese vyplývá, že kmeny AJ a B6 se pravděpodobně liší dráhou pro syntézu G3P. U myšího kmene B6 na ST dietě pozorujeme v chladu 8 °C na rozdíl od AJ signifikantní nárůst exprese *Gk* (Graf 4H) a pokles *Pck1* (Graf 4J). U AJ pozorujeme signifikantní nárůst *Pck1* (Graf 3J) a pouze trend v nárůstu exprese *Gk* (Graf 3H).



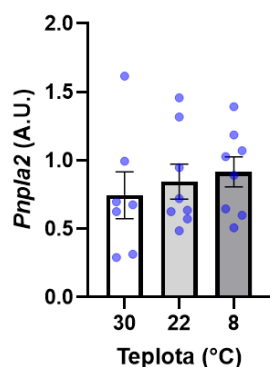


4.4. Vliv diety v kombinaci s teplotou na metabolismus BAT v rámci daného genotypu

U myši AJ, které byly krmeny HF dietou je vliv teploty na genovou expresi potlačen, pokud dochází k nárůstu exprese, tak pouze trendově (Grafy č. 5). Mírný nárůst exprese pozorujeme pouze u regulátoru lipolýzy *Plin5* (Graf 5L). U některých enzymů zodpovědných za *de novo* syntézu MK (*Acl*y - Graf 5B, *Fasn* – Grafy - 5G) dochází vlivem diety k trendovému poklesu exprese při 8 °C, což by mohlo být vysvětleno dostatečným příjmem MK z krve, trendově zvýšenou expresi nacházíme u přenašeče *Cd36* (Graf 5C). U kmene AJ krmeného HF dietou tedy nepozorujeme téměř žádné změny v expresi genů kódujících proteiny zapojené do metabolických drah. Otázkou zůstává, jaký je vliv genové exprese na množství proteinů a jejich aktivitu.



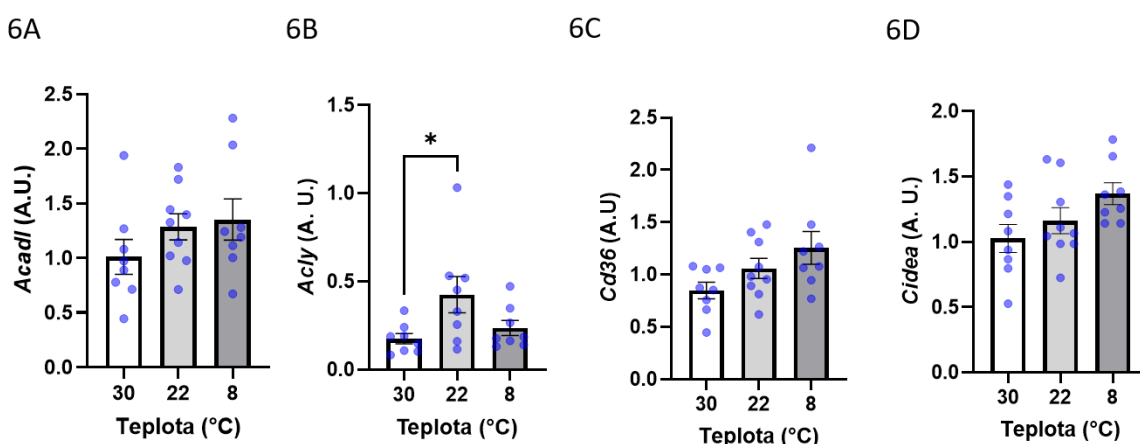
5M

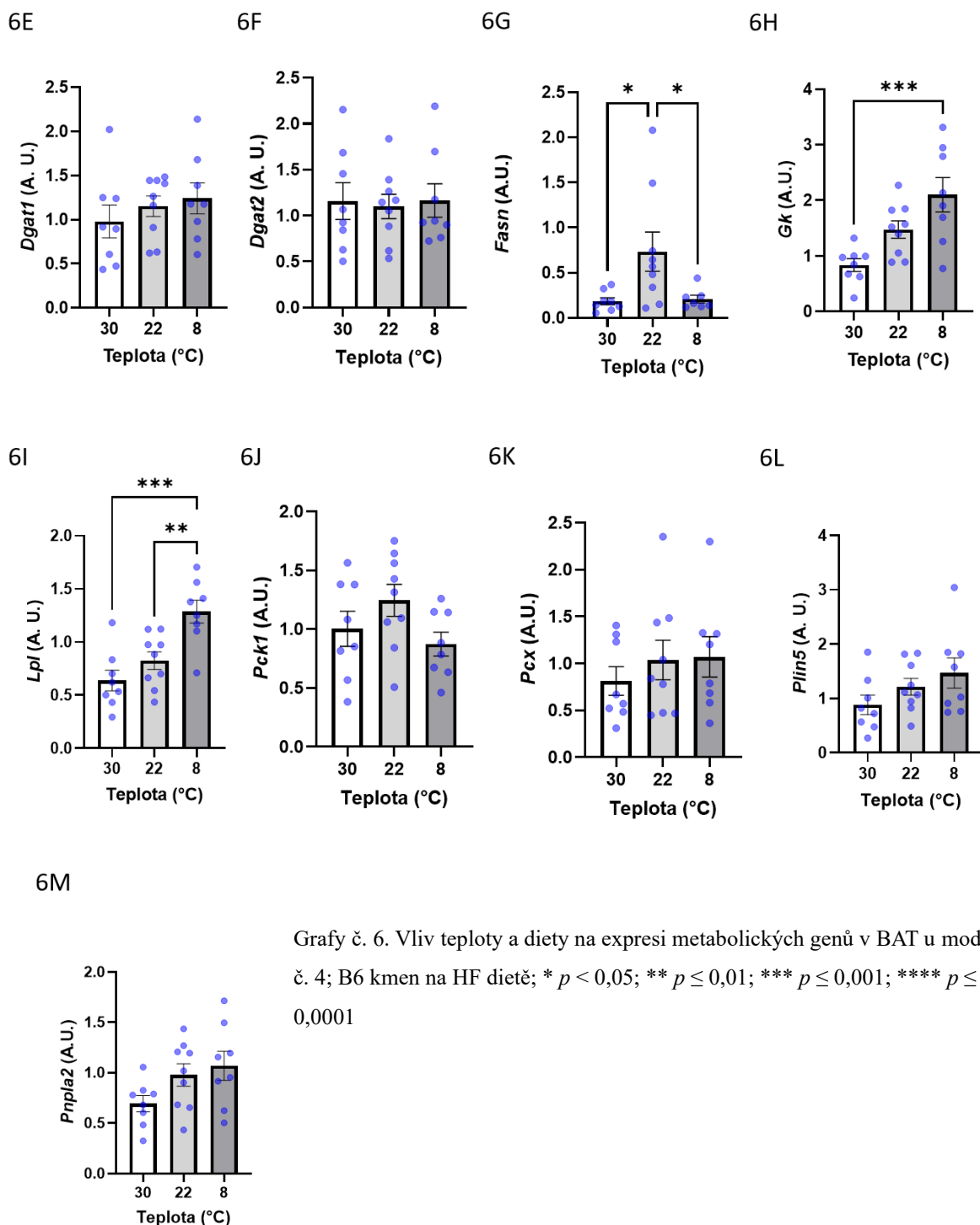


Grafy č. 5. Vliv teploty a diety na expresi metabolických genů v BAT u modelu č. 2; AJ kmen na HF dietě; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

U kmene B6 také pozorujeme potlačení vlivu teploty na genovou expresi HF dietou, ačkoli ne tak výrazně (Grafy č. 6). V 8 °C je zvýšena exprese genů pro proteiny spojené s příjmem MK do buňky a následnou lipogenezi a uložením TAG do tukových kapének (*Lpl* - Graf 6I, *Cd36* – Graf - 6C, *Gk* - Graf 6H, *Dgat1* - Graf 6E, *Cidea* – Graf 6D). Můžeme se tedy domnívat, že zde dochází k aktivní syntéze TAG z buňkou přijatých MK, což koresponduje s výsledky histologie, kdy u myši kmene B6 krmených HF dietou (Obr. 13B) nacházíme překvapivě větší lipidové kapénky v porovnání s B6 na ST dietě (Obr. 13A), i v porovnání s AJ na HF dietě (Obr. 12B).

Na rozdíl od AJ myši pozorujeme u B6 myši krmených HF dietou u některých enzymů signifikantní zvýšení exprese ve 22 °C. Jedná se o geny pro enzymy *de novo* syntézy MK (*Acly* - Graf 6B a *Fasn* – Graf 6G), což by mohlo poukazovat na utilizaci vlastních buněčných zásob při mírném chladu a příjmu MK do buněk při chladu 8 °C.





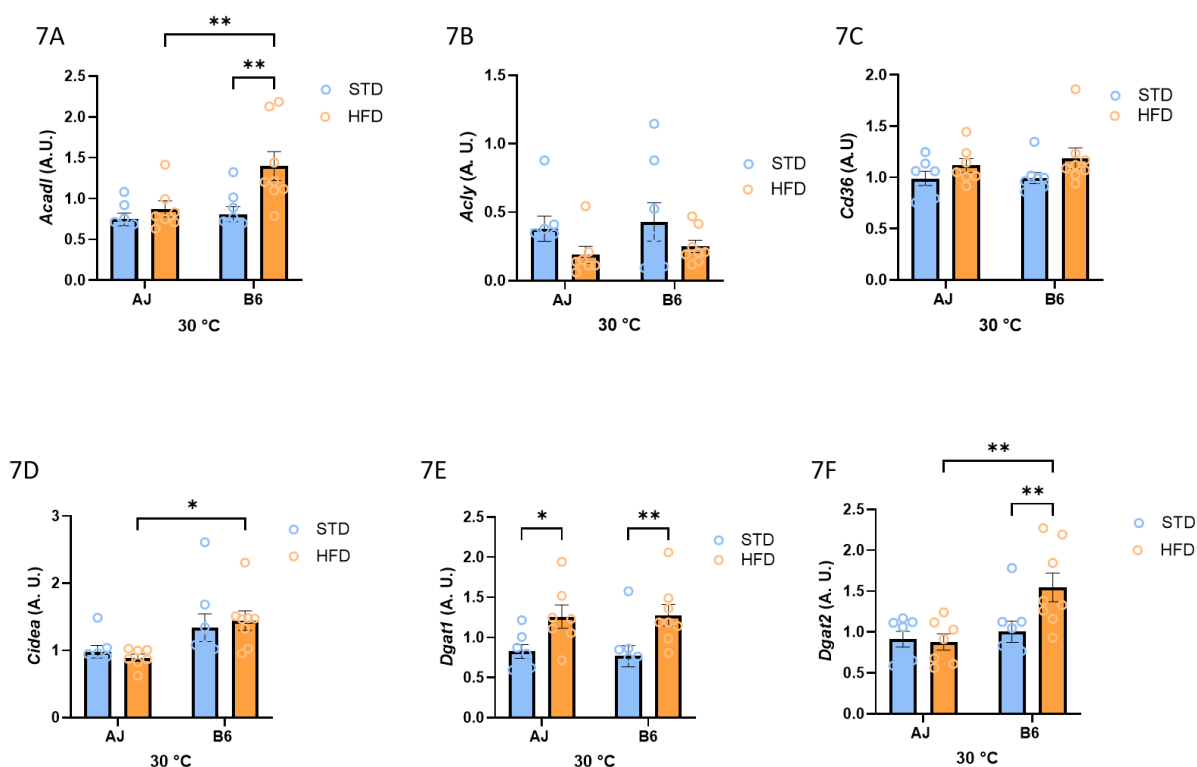
Grafy č. 6. Vliv teploty a diety na expresi metabolických genů v BAT u modelu č. 4; B6 kmen na HF dietě; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

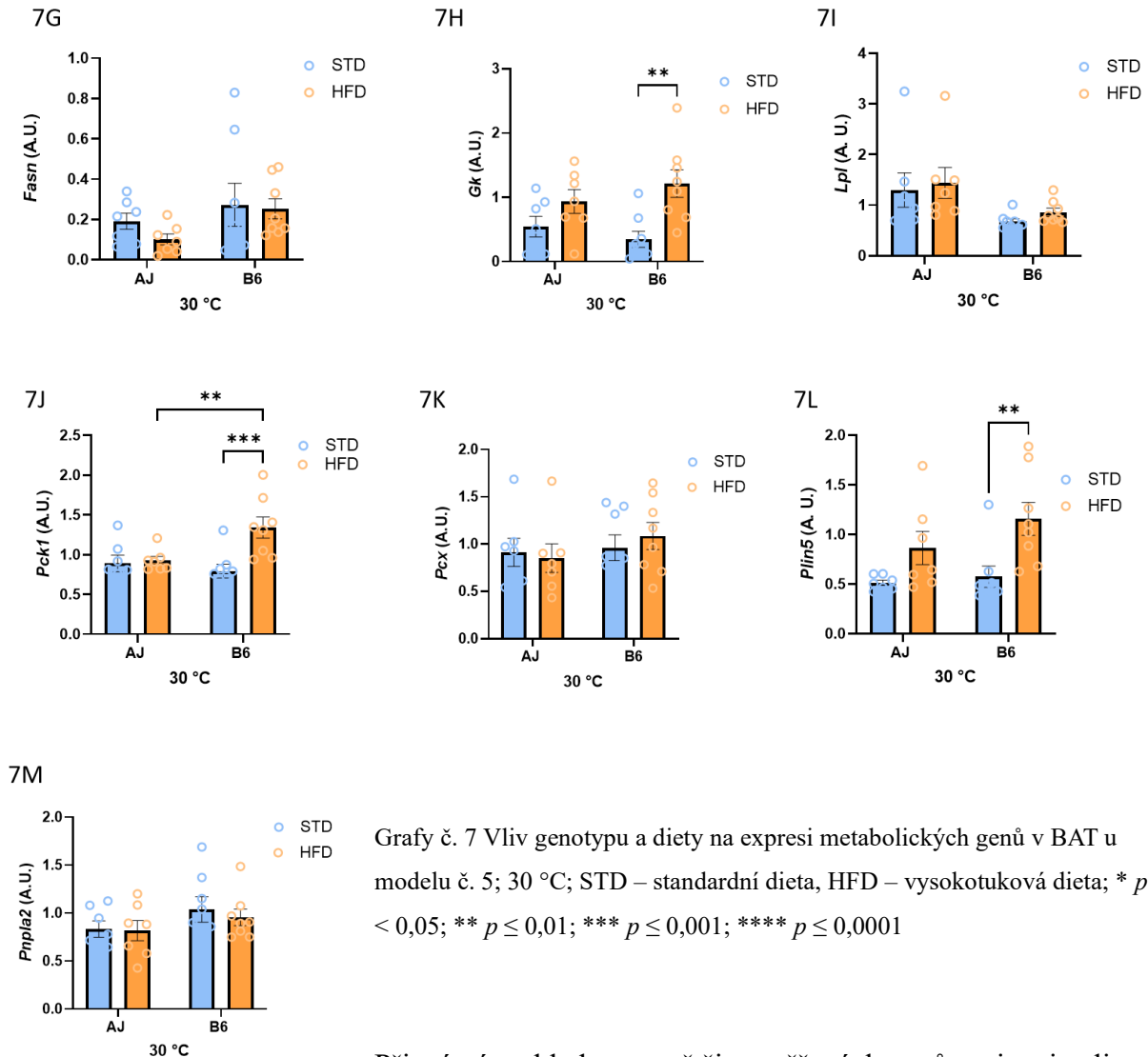
4.5. Vliv genotypu a diety na metabolismus BAT za dané teploty

V termoneutrální teplotě se projevuje vliv diety i genotypu na expresi genů kódujících proteiny zapojené do lipidového metabolismu v BAT (Grafy č. 7). U myši krmených HF dietou pozorujeme trendové zvýšení exprese genů kódujících proteiny zodpovědné za příjem MK do buňky (*Cd36* – Graf 7C, *Lpl* – Grafy 7I). Obecně lze z míry exprese soudit, že v závislosti na HF dietě probíhá syntéza TAG převážně z přijatých MK a G3P tvořeného GyK

(Graf 7H). Naznačuje to i zvýšená exprese *Dgat1* (Graf 7E) na rozdíl od *Dgat2* (Graf 7F). HF dieta také zvýšila expresi genu pro β -oxidaci MK (*Acadl* – Graf 7A) a zvyšuje expresi *Plin5* (Graf 7L), jehož protein reguluje lipolýzu. Z těchto dat vyplývá, že primární dráha aktivovaná HF dietou je lipogeneze z přijatých MK a β -oxidace. Předpoklad, že lipogeneze probíhá z přijatých MK je usuzován ze snížené exprese *Acly* při krmení HF dietou ve srovnání se ST dietou, a to u obou kmenů (Graf 7B).

Na expresi genu *Acadl* má vliv také genotyp myši, kdy B6 myši mají zvýšenou jeho expresi v porovnání s AJ myšmi (Graf 7A). Mezi další geny, jejichž exprese je ovlivněna především genotypem, patří *Cidea* (Graf 7D), *Dgat2* (Graf 7F), *Fasn* (Graf 7G) se zvýšenou expresí u B6 myši, což by mohlo značit zvýšenou tvorbu a ukládání TAG v porovnání s AJ myšmi, korespondující s výsledky z histologie, kde můžeme u B6 myši (Obr. 9A) pozorovat větší tukové kapénky než u AJ myši (Obr. 8A). Naopak exprese *Lpl* je zvýšena u AJ myši (Graf 7I), což by mohlo souviset s efektivnějším vychytáváním TAG z krve.



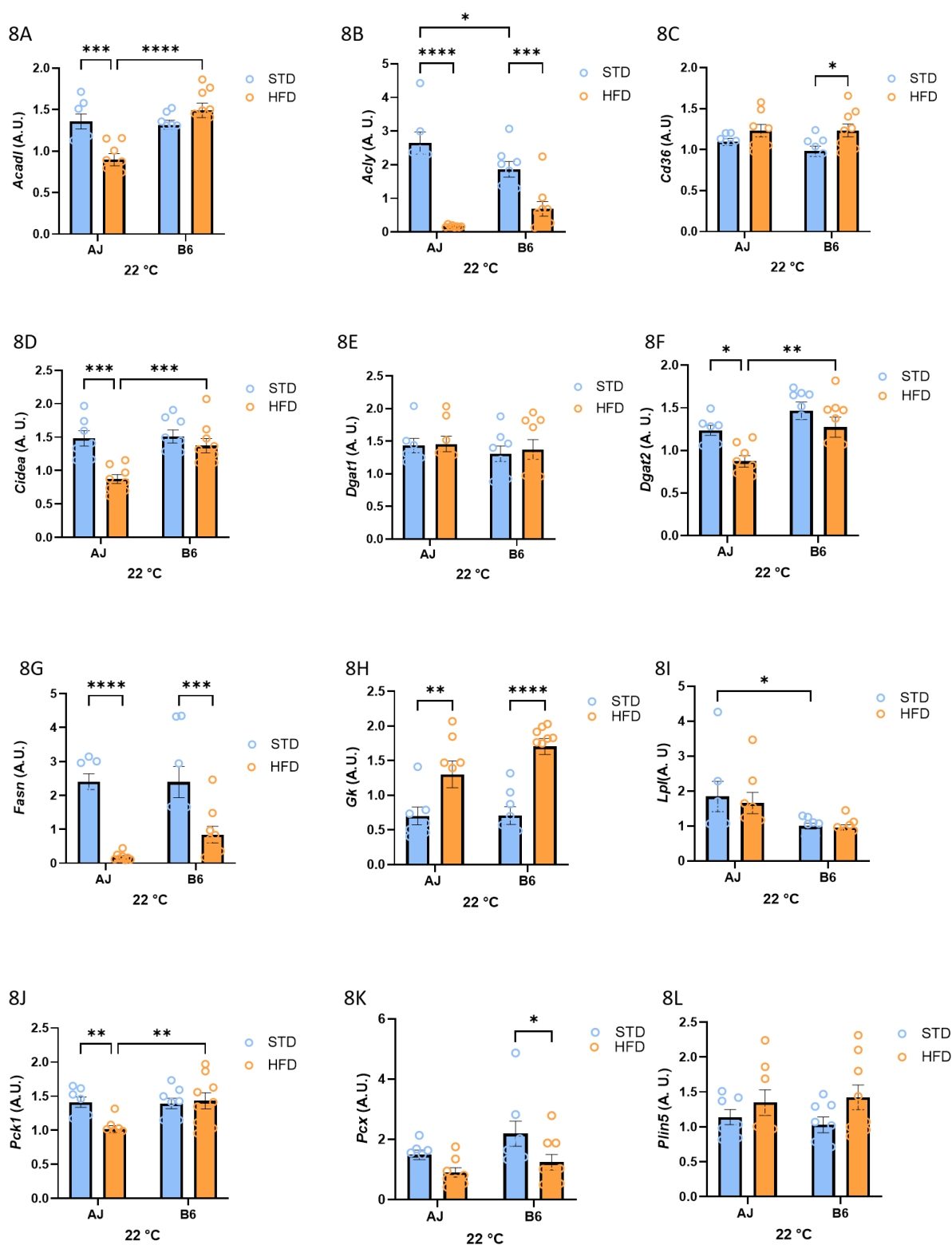


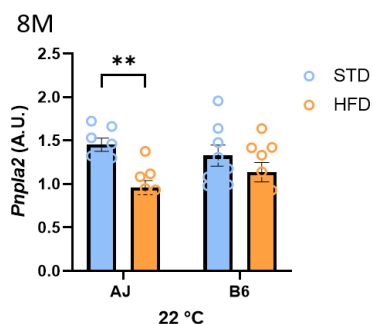
Grafy č. 7 Vliv genotypu a diety na expresi metabolických genů v BAT u modelu č. 5; 30 °C; STD – standardní dieta, HFD – vysokotuková dieta; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

Při mírném chladu se u většiny měřených genů projevuje vliv diety (Grafy č. 8). Myši krmené ST dietou mají v porovnání s myšmi krmenými HF dietou zvýšenou expresi genů *Acly* (Graf 8B), *Cidea* (Graf 8D), *Dgat2* (Graf 8F), *Fasn* (Graf 8G), *Pcx* (Graf 8K) a *Pnpla2* (Graf 8M). Tyto výsledky naznačují vyšší aktivitu lipidového cyklování (tvorba TAG, ukládání TAG do kapének a lipolýza) u myší na ST dietě v porovnání s myšmi krmenými HF dietou. HF dieta zvýšila expresi genu *Cd36* (Graf 8C), což naznačuje vyšší příjem MK do buněk.

U některých genů byl v BAT myší krmených HF dietou zaznamenán vliv genotypu, kdy kmen B6 má v porovnání s kmenem AJ zvýšenou expresi genů pro *Acadl* (Graf 8A), *Cidea* (Graf 8D) a *Dgat2* (Graf 8F). Tento rozdíl mezi genotypy pozorujeme i u myší aklimatizovaných na termoneutrální teplotu, stejně tak pozorujeme zvýšenou expresi *Lpl* u AJ myší v porovnání s myšmi B6 (Graf 8I). Při srovnání AJ a B6 aklimatizovaných na mírný chlad, krmených ST dietou, nenacházíme žádné výrazné rozdíly. U B6 myší pozorujeme zvýšenou expresi *Dgat2*

(Graf 8F), genu pro protein zodpovědný za syntézu TAG z *de novo* MK a *Pcx* (Graf 8K), která v tomto případě pravděpodobně slouží jako zdroj OAA pro dráhu *de novo* lipogeneze.





Grafy č. 8. Vliv genotypu a diety na expresi metabolických genů v BAT u modelu č. 6; 22 °C; STD – standardní dieta, HFD – vysokotuková dieta; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

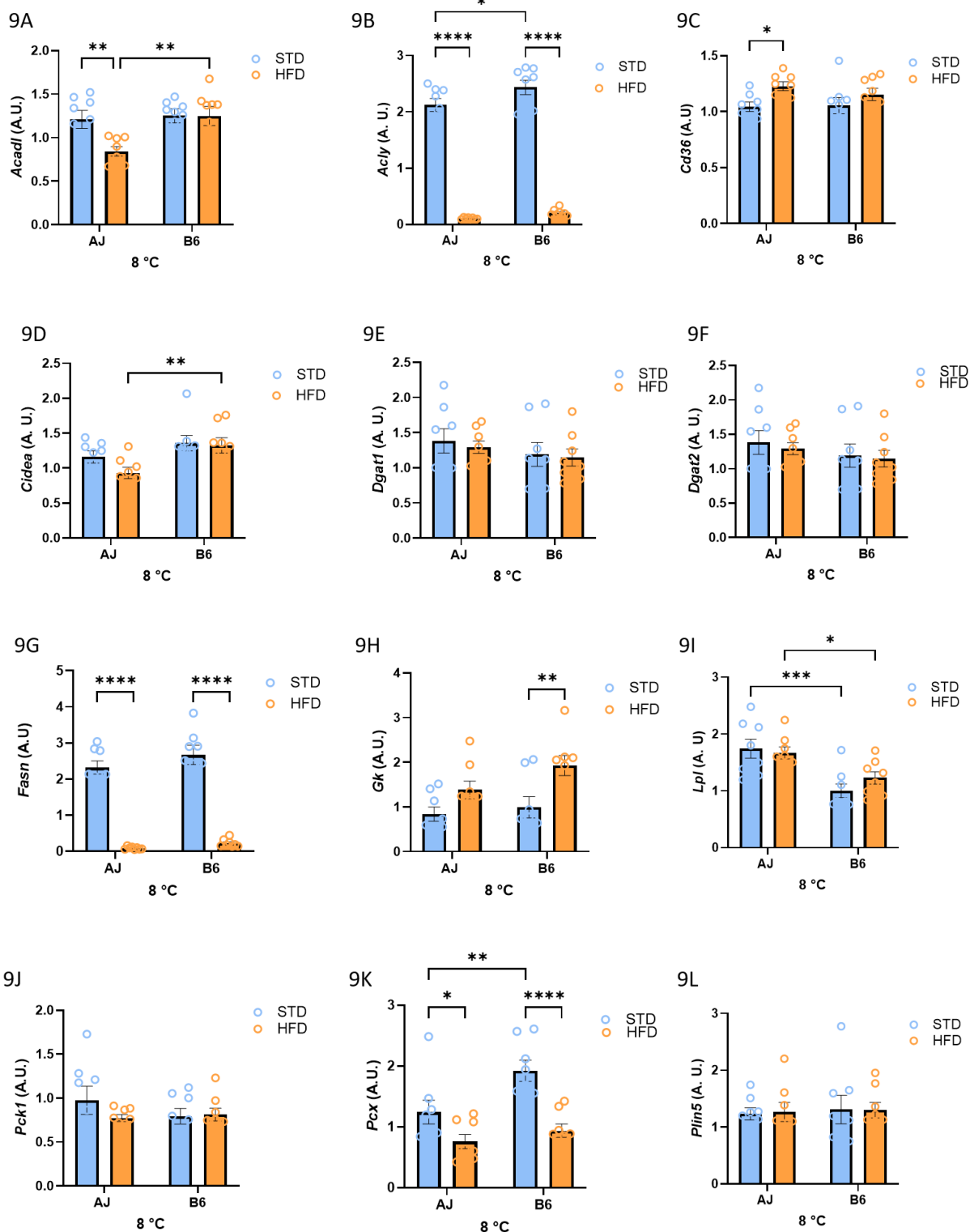
Při chladu 8 °C (Grafy č. 9) se podobně jako u mírného chladu projevuje efekt diety u *Acadl* (Graf 9A), *Acly* (Graf 9B), *Fasn* (Graf 9G), *Pcx* (Graf 9K) a *Pnpla2* (Graf 9M), kdy pozorujeme signifikantní snížení exprese genů u myši krmených HF dietou v porovnání se ST dietou, což poukazuje na zvýšené lipidové cyklování (lipogenze, lipolýza, β -oxidace) u myši na ST dietě. U myši krmených HF dietou pozorujeme zvýšenou expresi *Cd36* (Graf 9C) a *Gk* (Graf 9H), stejně jako bylo pozorováno v mírném chladu.

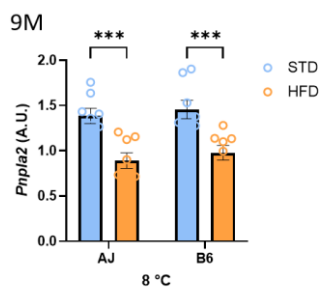
V chladu se i nejvíce projevují genotypové rozdíly. Vliv genotypu můžeme pozorovat napříč všemi změřenými expresemi genů. U některých genů příjem HF diety negativně ovlivňuje expresi pouze u AJ kmene, lze to pozorovat primárně na expresi *Acadl* (Graf 9A) a tendenci u genů *Pck1* (Graf 9J) a *Cidea* (Graf 9D). Z těchto dat lze usoudit, že HF dieta při aklimatizaci na chlad má v BAT negativní vliv na β -oxidaci a ukládání TAG u AJ myši, kdežto B6 myši jsou vůči těmto změnám rezistentní.

U *Acly* pozorujeme kromě velkého vlivu diety (zmíněno v předchozím odstavci) také vliv genotypu (Graf 9B), kdy myši z kmene B6 exprimují více tohoto genu, což může souviset se zvýšenou lipogenezí, ale taktéž s regulací mitochondriálního stresu a indukovanou termogenezí. U myši B6 aklimatizovaných na chlad také můžeme pozorovat vyšší expresi *Pcx* (Graf 9K). Trend tohoto nárůstu genové exprese jsme mohli pozorovat již ve 22 °C (Graf 8K).

Expres genů pro *Lpl* je při srovnání B6 a AJ kmenů naopak zvýšena u AJ myši v obou případech diety, stejně jako lze pozorovat napříč všemi teplotami a patrně to souvisí s již zmíněným vychytáváním MK z krevního oběhu. S klesající teplotou můžeme též pozorovat zvětšující se rozdíl v expresi mezi jednotlivými genotypy (Grafy 7I, 8I, 9I)

Jak již bylo zmíněno v bodě 4.3., i zde lze pozorovat rozdíly exprese *Gk* a *Pck1*, kdy B6 mají mírně zvýšenou expresi *Gk* (Graf 9H) a u AJ je celkově vyšší expres *Pck1* (Graf 9J). Rozdíly jsou pozorovatelné pouze jako trend, nikoli signifikance.





Grafy č. 9. Vliv genotypu a diety na expresi metabolických genů v BAT u Modelu 7; 8 °C; STD – standardní dieta, HFD – vysokotuková dieta; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

5. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo pomocí genové exprese a histologických metod charakterizovat metabolismus BAT, klíčového orgánu pro NST, ve vztahu k potenciálnímu zapojení lipidového cyklování, a to u dvou geneticky odlišných myších kmenů AJ a B6, které se liší v míře rozvoje obezity a místem aktivace NST (Janovska et al. 2023). Na základě předchozích studií bylo ukázáno, že AJ myši mají nižší aktivaci UCP1 zprostředkované NST v BAT, a mohly by tak využívat alternativní mechanismy, např. TAG/MK cyklování, a svalovou NST, podobně jako modely s delecí *Ucp1* (Oeckl et al. 2022).

5.1. Vliv okolní teploty a diety na velikost tukových kapének v BAT

Dle aktuálně dostupné literatury nejsou k dispozici srovnávací studie hodnotící morfologii tukových kapének v BAT u kmenů AJ a B6 po vystavení chladu na 14 dní či na HF dietě. V rámci této diplomové práce bylo ukázáno zmenšování lipidových kapének při chladové aklimatizaci, což je v souladu s publikací z roku 2015, kdy u B6 myši k remodelaci (zmenšování) kapének docházelo již po 4 hodinách ve 4 °C (Yu et al. 2015). Tento pokus zahrnoval pouze porovnání myši aklimatizovaných na laboratorní teplotu (22-25 °C) s myšmi vystavenými akutnímu chladu (4 °C, maximální doba vystavení chladu byla 72 h), nemáme tedy srovnání s termoneutrální teplotou (30 °C). Ve 30 °C je NST inaktivována, energie tedy není potřeba, a proto se tuk ukládá do tukových kapének, které byly pozorovány jako zvětšené.

Lipidové kapénky byly obecně větší u kmene B6 ve srovnání s AJ kmenem, což bylo nejlépe pozorovatelné v termoneutrální teplotě, či v chladu 8 °C na HF dietě, z dostupné literatury lze soudit, že B6 myši by ve srovnání s AJ myšmi mohly mít sníženou funkci buněčných lipáz (ATGL/HSL), která způsobuje zvětšený fenotyp tukových kapének (Mouisel et al. 2025). V diplomové práci byl pozorován vliv HF diety v termoneutrální teplotě, kdy došlo ke zmenšení tukových kapének u obou kmenů v porovnání se ST dietou. U myši kmene B6 v dostupné literatuře došlo po konzumaci HF diety naopak ke zvětšení lipidových partikul po

konzumaci HF diety po dobu 4 a 20 týdnů. Autor velikosti tukových kapének po dvou týdnech konzumace HF diety v publikaci nezveřejnil, ale zmiňuje, že z výsledků předpokládá, že BAT u B6 myši zvyšuje svou schopnost spalovat MK v reakci na přetížení tukem, avšak výrazná obezita snižuje odpověď BAT na tuk, a to pravděpodobně prostřednictvím narušení mitochondriálních funkcí (Ohtomo et al. 2017). Proto se lze domnívat, že 14 dní je nedostatečná doba pro nárůst tukových kapének, jelikož ještě nedošlo k desenzitizaci BAT na vysoké množství tuku. Na základě výsledků této studie a výsledků této diplomové práce lze předpokládat, že BAT se v rané fázi (14 dní) konzumace HF diety adaptuje přestavbou své struktury. Dlouhodobý příjem HF diety však vede k akumulaci TAG, ztrátě typické multilokulární morfologie a přechodu BAT k fenotypu bílé tukové tkáně, což je doprovázeno i poklesem její metabolické aktivity.

5.2. Vliv okolní teploty a diety na míru exprese *Ucp1*

Zvýšená exprese *Ucp1* v chladu byla u B6 již dříve prokázána (Grefhorst et al. 2018), v tomto experimentu autor myši vystavil chladu pouze po 24h, přesto již byla pozorována zvýšená exprese *Ucp1*. Jako kontrola byla použita skupina myši aklimatizovaná na 23 °C, což pro myši znamená mírný chlad. Porovnání se skupinou myši aklimatizovaných na termoneutrální teplotu chybí. Srovnání myších kmenů AJ a B6 v rámci exprese *Ucp1* v BAT již bylo zkoumáno při týdenní aklimatizaci v 6 °C, výsledky ukázaly podobné navýšení exprese v chladu u obou kmenů, což koresponduje s výsledky této práce (Janovska et al. 2023). Nicméně, zvýšení exprese *Ucp1* není nutně spojeno se zvýšenou termogenezí, což ukazuje, že samotná exprese *Ucp1* není dostatečná pro zvýšení termogenní aktivity (*Li a Fromme 2022).

Zvýšená exprese *Ucp1* u B6 myši krmených HF dietou po dobu 14 dnů již byla v literatuře dříve prokázána, výsledky odpovídají výsledkům této diplomové práce (Ohtomo et al. 2017). V případě delší doby konzumace HF diety (12 týdnů) došlo dle dostupné literatury u B6 myši ke snížení exprese *Ucp1* (Shirkhani et al. 2018), což by mohlo souviset se zvětšujícími se tukovými kapénkami a celkovým poklesem metabolické aktivity zmíněnými v bodě 5.1. Při porovnání teplotně závislé exprese *Ucp1* u myši krmených ST a HF dietou se projevil negativní vliv HF diety na expresi *Ucp1*. Nárůst exprese vykazoval významnější signifikanci u myši krmených ST dietou.

5.3. Vliv okolní teploty na expresi metabolických genů v BAT

Chlad zvýšil expresi všech sledovaných drah u obou myších kmenů. Neexistují konkrétní studie porovnávající změny genové exprese metabolických genů v BAT u myších kmenů AJ a

B6 v závislosti na chladové aklimatizaci. U B6 kmene již dříve byla prokázána zvýšená exprese genů jejichž, proteiny ovlivňují metabolismus v závislosti na chladu. Například při akutním chladu 4 °C byla zvýšena exprese genů pro glykolýzu, β -oxidaci a *de novo* lipogenezi (Yu et al. 2002). U AJ kmene docházelo ke zvyšování genové exprese s klesající okolní teplotou, u B6 kmene byla nejvýraznější aktivace exprese pozorována v mírném chladu (22 °C), což se shoduje s výsledky předešlé studie. V mírném chladu byla pozorována aktivace exprese genů pro *de novo* lipogenezi a β -oxidaci (Sanchez-Gurmaches et al. 2018). V chladu (8 °C) naopak exprese genů u B6 byla snížena s výjimkou exprese *Acly*. ACLY je protein související nejen s lipogenezí, ale také s regulací mitochondriálního stresu a s tím spojenou UCP1 indukovanou termogenezí (Korobkina et al. 2024). Exprese *Acly* byla vyšší u B6 v porovnání s AJ, což je v souladu s výsledky studie z naší laboratoře (Janovska et al. 2023), kdy bylo zjištěno, že B6 myši využívají víc BAT pro NST, na rozdíl od AJ myši.

Na základě genové exprese se zdá, že kmeny AJ a B6 se liší ve využívání drah pro syntézu G3P. U myšního kmene B6 na ST dietě byla v chladu (8 °C) pozorována signifikantní zvýšená exprese *Gk* a současně pokles exprese *Pck1*, což naznačuje, že tento kmen pravděpodobně preferuje *Gk* jako klíčový enzym při tvorbě G3P. Naopak u myšního kmene AJ došlo k signifikantnímu zvýšení exprese *Pck1*, přičemž u exprese *Gk* byl pouze trend k nárůstu. To naznačuje, že AJ myši v chladu upřednostňují dráhu přes *Pck1*, zatímco B6 myši upřednostňují dráhu přes *Gk*. V literatuře není zatím žádná studie, která by se podrobněji zabývala těmito rozdíly mezi kmeny AJ a B6, což naznačuje, že se jedná o dosud neprozkoumanou oblast výzkumu.

5.4. Vliv okolní teploty a diety na expresi metabolických genů v BAT

U kmene AJ příjem HF diety potlačoval nárůst genové exprese v chladu, u kmene B6 snížení exprese genů nebylo tak výrazné. V porovnání s genovou expresí v mírném chladu došlo u kmene AJ aklimatizovaného na chlad k poklesu exprese u genů pro enzymy podílející se na tvorbě MK (*Fasn*, *Acly*). Vzhledem ke zvýšené expresi *Cd36* v chladu se lze domnívat, že je to z důvodu vysokého příjmu MK z krve. Tato teorie je podpořena již zmíněnými studiemi, které prokázaly, že při chladové aklimatizaci BAT spotřebovává více TAG z krevního řečiště než kosterní svalstvo (Festuccia et al. 2009; Bartelt et al. 2011). U kmene B6 pozorujeme v chladu při krmení HF dietou zvýšenou expresi genů pro lipogenezi z buňkou přijatých MK a následné ukládání do lipidových kapének (*Lpl*, *Cd36*, *Gk*, *Dgat1*, *Cidea*), což bylo v souladu s histologickými nálezy popisovanými v bodě 5.1. Jak již bylo zmíněno, jedním z možných důvodů zvětšených lipidových kapének by mohla být snížená aktivita lipáz; tento předpoklad

se ale neprojevil na expresi genu *Pnpla2*, exprese genu kódujícího HSL v této práci měřena nebyla (Mouisel et al. 2025).

Z výsledků měření genové exprese lze usoudit, že myši kmene B6 při mírném chladu aktivují dráhu *de novo* lipogeneze, jak ukazuje signifikantně zvýšená exprese *Acly* a *Fasn*, genů, jejichž proteiny jsou zapojeny do syntézy MK, kdežto v chladu 8 °C přijímají MK spíše z krve (navýšení exprese genů *Cd36*, *Lpl*). Zatím neexistují žádné studie pro porovnání těchto výsledků.

5.5. Vliv genotypu a diety na expresi metabolických genů v BAT za dané teploty

V termoneutrální teplotě konzumace HF diety vedla ke zvýšené expresi genů kódujících proteiny zodpovědné za příjem MK do buněk (*Lpl*, *Cd36*), zvýšené expresi *Dgat1* a snížené expresi *Acly*, což naznačuje zvýšenou aktivitu lipogeneze z přijatých MK. Tyto výsledky jsou v souladu s publikací z roku 2021, kde měly myši v termoneutrální teplotě (30 °C) krmené HF dietou sníženou expresi genů pro *de novo* lipogenezi; *Fasn*, *Acly* a *Acaca* - gen kódující acetyl-CoA karboxylázu (Schlein et al. 2021). U AJ myši byla zvýšená exprese *Lpl*, což může signalizovat efektivnější využívání TAG z krve. Dále HF dieta pravděpodobně stimulovala β -oxidaci MK, což se projevilo zvýšenou expresí genu *Acadl*. Vliv teploty a diety byl na B6 myších již studován v roce 2020, experiment zahrnoval 2 různé teploty (28-30 °C, 23 °C) (Shi et al. 2021), výsledky se zčásti shodují s výsledky v této diplomové práci. V termoneutrální teplotě se zde projevila zvýšená exprese genů pro lipogenezi a β -oxidaci u myši krmených HF dietou. Srovnání genové exprese s kmenem AJ se bohužel v dostupné literatuře nevyskytuje. Výsledky diplomové práce poukazují na zvýšenou expresi genů pro proteiny spojené s lipogenezí u B6 myši v porovnání s AJ myšmi, konkrétně geny *Acadl*, *Dgat2*, *Cidea* a *Fasn*, což by mohlo znamenat zvýšenou tvorbu a ukládání TAG, jak ukazují zvětšené tukové kapénky již zmíněné v bodě 5.1. Vliv diety na genovou expresi v BAT byl sledován v laboratorní teplotě (23 $\pm$ 1 °C). Po krmení HF dietou došlo ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny β -oxidace, což je v souladu s i výsledky této práce, kdy toto zvýšení lze pozorovat ve 22 °C i ve 30 °C (Ohtomo et al. 2017). U AJ myši byla naopak zvýšená exprese *Lpl*, a to při každé sledované teplotě, což může signalizovat lepší vychytávání TAG z krevního oběhu. Tento výsledek ale odporuje studii z roku 1993, kdy bylo měřeno množství TAG v plasmě při krmení ST i HF dietou a v obou případech kmen AJ měl vyšší koncentraci v porovnání s B6 myšmi (Nishina et al. 1993). To poukazuje na fakt, že zvýšená exprese genu nutně neznamená vyšší aktivitu proteinu.

Při mírném chladu byl pozorován negativní vliv HF diety v porovnání se ST dietou na expresi genů pro lipidové cyklování (lipogeneze, lipolýza). Byly pozorovány stejné genotypové rozdíly jako v termoneutrální teplotě. V dostupné literatuře bylo popsáno zvýšení exprese *Pnpla2* u B6 kmene po krmení HF dietou (Sklioutovskaya-Lopez et al. 2019). Ve výsledcích měření genové exprese jsme toto zvýšení nepozorovali ani při jedné ze tří sledovaných teplot; naopak jsme zaznamenali pokles exprese ve srovnání se standardní dietou. Rozdíly v genové expresi mohou být dány rozdílnou dobou krmení HF dietou (16 týdnů ve srovnání se dvěma týdny), myši by pravděpodobně musely být krmeny HF dietou déle, aby se rozdíl projevil.

Při vystavení myši teplotě 8 °C dochází k výraznému ovlivnění exprese genů lipidového metabolismu jak vlivem diety, tak genotypu. U myši krmených HF dietou je patrné snížení exprese genů spojených s *de novo* lipogenezi (*Acly*, *Fasn*), β -oxidací (*Acadl*) a lipolýzou (*Pnpla2*), což naznačuje, že na ST dietě je v chladu aktivnější lipidové cyklování. Na možnou vyšší aktivitu cyklování poukazuje i zvýšená exprese *Dgat1* a *Dgat2* právě u ST diety. Naopak u myši krmených HF dietou dochází ke zvýšené expresi genů *Cd36* a *Gk*, tedy genů spojených s příjmem MK do buňky a tvorbou G3P pro syntézu TAG, což odpovídá i pozorovaným změnám v expresi při aklimatizaci v mírném chladu. Tyto výsledky jsou v souladu se studií, kdy při akutním chladu (4 °C) u myši krmených HF dietou bylo pozorováno potlačení genové exprese *Fasn*, a naopak zvýšena exprese genů *Cd36* a *Lpl*, jejichž proteiny jsou zodpovědné za příjem MK do buněk (Shi et al. 2021). V chladu se také nejvíce projevují rozdíly mezi kmeny. U některých genů je negativní vliv HF diety zřetelný především u AJ myši, například u genů *Acadl*, *Pck1* a *Cidea*, což může znamenat sníženou β -oxidaci a omezenou schopnost ukládání TAG v BAT při zátěži chladem na rozdíl od B6 myši. U genu *Acly*, kromě výrazného dietního efektu, pozorujeme i vyšší expresi u B6 myši, což by mohlo odrážet zvýšenou lipogenezi, ale také zapojení do regulace mitochondriálního stresu a s tím související podporu termogeneze v BAT, což, jak bylo zmíněno, je v souladu s výsledky z naší laboratoře (Janovska et al. 2023).

6. Závěr

Cíle této diplomové práce vytyčené v kapitole 2 byly splněny využitím histologických metod (velikost tukových kapének) a analýzy genové exprese (*Ucp1*, metabolické geny).

1. Velké množství malých tukových kapének bylo pozorováno v BAT myši aklimatizovaných na 22 °C (mírný chlad) nebo 8 °C (chlad), u obou genotypů (AJ a B6), v porovnání s BAT myši aklimatizovaných na 30 °C (termoneutrální teplota).

Konzumace HF diety (2 týdny) zmenšila tukové kapénky v BAT u myši aklimatizovaných na termoneutrální teplotu bez rozdílu genotypu. U myši krmených ST dietou měl kmen AJ v porovnání s B6 kmenem menší tukové kapénky napříč všemi teplotami.

2. Expresi *Ucp1* genu se zvyšovala s klesající teplotou, zatímco příjem HF diety naopak expresi potlačoval u obou kmenů. V termoneutrální teplotě konzumace HF diety navýšila expresi *Ucp1* v porovnání se ST dietou. Při srovnání exprese *Ucp1* mezi kmeny byla zjištěna vyšší exprese u AJ.
3. U všech měřených genů obou myších kmenů došlo k navyšování exprese se snižující se teplotou, liší se pouze míra navýšení. U AJ myši bylo zaznamenáno postupné navýšení exprese na rozdíl od B6 myši, kde naopak docházelo k nejvýznamnějšímu navýšení mezi 30–22 °C. Z analýzy genové exprese vyplývá, že se kmeny při chladové adaptaci pravděpodobně liší dráhou syntézy G3P. AJ myši využívaly část glukoneogenní dráhy přes PEPCCK (*Pck1*) na rozdíl od B6 myši, které využívaly GyK (*Gk*).
4. HF dieta potlačovala nárůst genové exprese při vystavení chladu (22 °C, 8 °C), především u myšního kmene AJ. Výsledky z měření u AJ naznačují zvýšený příjem MK z krevního oběhu v chladu, čímž se dá vysvětlit snížená exprese genů pro enzymy potřebné pro syntézu MK. U kmene B6 byla v chladu zjištěna zvýšená exprese genů pro příjem MK do buněk, lipogenezi a ukládání TAG, což korespondovalo s histologickými výsledky, kdy byly v chladu v BAT myši krmených HF dietou pozorovány zvětšené lipidové kapénky. Výsledky jsou v souladu i s hmotnostmi myši a hmotností BAT.
5. V termoneutrální teplotě se myši kmeny liší v dráze lipogeneze. Kmen B6 dle výsledků genové exprese v porovnání s kmenem AJ syntetizuje a ukládá více TAG nezávisle na dietě. Toto zjištění je v souladu s výsledky z histologie, kde byly pozorovány větší lipidové kapénky u kmene B6, i s nárůstem hmotnosti myši. V termoneutrální teplotě HF dieta aktivovala expresi genů pro proteiny lipogenní dráhy a β -oxidace. V mírném chladu byl pozorován negativní vliv HF diety na expresi genů pro lipidové cyklování, genotypové rozdíly byly jako v termoneutrální teplotě. V chladu byl taktéž pozorován negativní vliv HF diety na expresi genů metabolických drah lipidového cyklování. V chladu byly nejlépe viditelné rozdíly mezi myšími kmeny. Z výsledků lze shrnout, že příjem HF diety snižoval expresi genů pro ukládání TAG a β -oxidaci více u AJ myši v porovnání s B6 myši aklimatizovanými na 8 °C.

Další genotypový rozdíl byl nalezen v expresi *Acl*y, u myší krmených ST dietou, která byla u B6 myší vyšší než u AJ. Naopak exprese genu *Lpl* byla zvýšena u AJ kmene v porovnání s B6 kmenem bez rozdílu diety a teploty aklimatizace. I zde byl pozorován rozdíl v expresi *Gk* a *Pck1* zmíněný v bodě 3.

Výsledky diplomové práce prokázaly, že teplota okolního prostředí a typ konzumované diety ovlivňují morfologii BAT, a taktéž míru exprese genů pro proteiny zapojené do lipidového metabolismu a termogeneze. Aklimatizace na nižší teploty (22 °C, 8 °C) vedla ke zmenšování tukových kapének v BAT a signifikantnímu nárůstu exprese *Ucp1* u obou myších kmenů AJ a B6. Krmení HF dietou nárůst exprese *Ucp1* s klesající teplotou tlumilo, u myší v termoneutrální teplotě byla exprese *Ucp1* v porovnání se ST dietou zvýšená. HF dieta v chladu snížila expresi genů pro proteiny podílející se na funkci lipidového metabolismu (β -oxidace, lipogeneze, lipolýza), což poukazuje na sníženou schopnost chladové adaptace prostřednictvím BAT, především u kmene AJ. Genotypové rozdíly se projevily především v expresi genů pro proteiny odpovědné za syntézu G3P. AJ myši zvyšovali expresi *Pck1*, zatímco u B6 myší byla zvýšená exprese *Gk*, z čehož vyplývá, že se tyto dva kmeny pravděpodobně liší v preferenci syntézy G3P.

7. Seznam literatury

- Ahlabo, Irène, a Tudor Barnard. 1971. „OBSERVATIONS ON PEROXISOMES IN BROWN ADIPOSE TISSUE OF THE RAT". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 19 (11): 670–75. <https://doi.org/10.1177/19.11.670>.
- Ahmadian, Maryam, Marcia J. Abbott, Tianyi Tang, Carolyn S. S. Hudak, Yangha Kim, Matthew Bruss, Marc K. Hellerstein, et al. 2011. „Desnutrin/ATGL Is Regulated by AMPK and Is Required for a Brown Adipose Phenotype". *Cell Metabolism* 13 (6): 739–48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.002>.
- Arita, Yukio, Shinji Kihara, Noriyuki Ouchi, Masahiko Takahashi, Kazuhisa Maeda, Jun-ichiro Miyagawa, Kikuko Hotta, et al. 1999. „Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257 (1): 79–83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>.
- Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, et al. 2000. „Disruption of the Uncoupling Protein-2 Gene in Mice Reveals a Role in Immunity and Reactive Oxygen Species Production". *Nature Genetics* 26 (4): 435–39. <https://doi.org/10.1038/82565>.
- Avtanski, Dimitar, Valentin A. Pavlov, Kevin J. Tracey, a Leonid Poretsky. 2019. „Characterization of Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Male C57BL/6J Mouse Model of Obesity". *Animal Models and Experimental Medicine* 2 (4): 252–58. <https://doi.org/10.1002/ame2.12084>.
- Bachman, Eric S., Harveen Dhillon, Chen-Yu Zhang, Saverio Cinti, Antonio C. Bianco, Brian K. Kobilka, a Bradford B. Lowell. 2002. „ β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance". *Science* 297 (5582): 843–45. <https://doi.org/10.1126/science.1073160>.
- Bardova, Kristina, Petra Janovska, Anna Vavrova, Jan Kopecky, a Petr Zouhar. 2024. „Adaptive Induction of Nonshivering Thermogenesis in Muscle Rather Than Brown Fat Could Counteract Obesity". *Physiological Research* 73 (Suppl 1): S279–94. <https://doi.org/10.33549/physiolres.935361>.
- Barquissau, V., D. Beuzelin, D.F. Pisani, G.E. Beranger, A. Mairal, A. Montagner, B. Roussel, et al. 2016. „White-to-Brite Conversion in Human Adipocytes Promotes Metabolic Reprogramming towards Fatty Acid Anabolic and Catabolic Pathways". *Molecular Metabolism* 5 (5): 352–65. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.03.002>.
- Bartelt, Alexander, Oliver T Bruns, Rudolph Reimer, Heinz Hohenberg, Harald Ittrich, Kersten Peldschus, Michael G Kaul, et al. 2011. „Brown Adipose Tissue Activity Controls Triglyceride Clearance". *Nature Medicine* 17 (2): 200–205. <https://doi.org/10.1038/nm.2297>.
- Bengtsson, T., B. Cannon, a J. Nedergaard. 2000. „Differential Adrenergic Regulation of the Gene Expression of the Beta-Adrenoceptor Subtypes Beta1, Beta2 and Beta3 in Brown Adipocytes". *The Biochemical Journal* 347 Pt 3 (Pt 3): 643–51.
- Bokor, Szilvia, Vanessa Legry, Aline Meirhaeghe, Jonatan R. Ruiz, Beatrice Mauro, Kurt Widhalm, Yannis Manios, et al. 2010. „Single-nucleotide Polymorphism of CD36 Locus and Obesity in European Adolescents". *Obesity* 18 (7): 1398–1403. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.412>.
- Boogaerts, J. R., M. Malone-McNeal, J. Archambault-Schexnayder, a R. A. Davis. 1984. „Dietary carbohydrate induces lipogenesis and very-low-density lipoprotein synthesis". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 246 (1): E77–83. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.246.1.E77>.
- Boord, Jeffrey B., Kazuhisa Maeda, Liza Makowski, Vladimir R. Babaev, Sergio Fazio, MacRae F. Linton, a Gökhan S. Hotamisligil. 2002. „Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein, aP2, Alters Late Atherosclerotic Lesion Formation in Severe

- Hypercholesterolemia". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (10): 1686–91. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000033090.81345.E6>.
- Braun, Katharina, Josef Oeckl, Julia Westermeier, Yongguo Li, a Martin Klingenspor. 2018. „Non-Adrenergic Control of Lipolysis and Thermogenesis in Adipose Tissues". Editoval Raul K. Suarez a Hans H. Hoppeler. *Journal of Experimental Biology* 221 (Suppl_1): jeb165381. <https://doi.org/10.1242/jeb.165381>.
- Cabré, A., I. Lázaro, J. Girona, J. M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, a L. Masana. 2007. „Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients". *Atherosclerosis* 195 (1): e150–58. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.045>.
- Cabré, Anna, Iolanda Lázaro, Montserrat Cofán, Estibaliz Jarauta, Núria Plana, Angel L. Garcia-Otín, Juan F. Ascaso, et al. 2010. „FABP4 Plasma Levels Are Increased in Familial Combined Hyperlipidemia". *Journal of Lipid Research* 51 (5): 1173–78. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900066-JLR200>.
- Cabré, Anna, Iolanda Lázaro, Josefa Girona, Josep M Manzanares, Francesc Marimón, Núria Plana, Mercedes Heras, a Lluís Masana. 2008. „Plasma Fatty Acid-Binding Protein 4 Increases with Renal Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients without Microalbuminuria". *Clinical Chemistry* 54 (1): 181–87. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.094672>.
- Cannon, Barbara, a Jan Nedergaard. 1979. „The Physiological Role of Pyruvate Carboxylation in Hamster Brown Adipose Tissue". *European Journal of Biochemistry* 94 (2): 419–26. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12909.x>.
- Cao, Wenhong, Kiefer W. Daniel, Jacques Robidoux, Pere Puigserver, Alexander V. Medvedev, Xu Bai, Lisa M. Floering, Bruce M. Spiegelman, a Sheila Collins. 2004. „P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene". *Molecular and Cellular Biology* 24 (7): 3057–67. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004>.
- Carey, A. L., M. F. Formosa, B. Van Every, D. Bertovic, N. Eikelis, G. W. Lambert, V. Kalff, S. J. Duffy, M. H. Cherk, a B. A. Kingwell. 2013. „Ephedrine Activates Brown Adipose Tissue in Lean but Not Obese Humans". *Diabetologia* 56 (1): 147–55. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2748-1>.
- Carneheim, C., J. Nedergaard, a B. Cannon. 1984. „Beta-Adrenergic Stimulation of Lipoprotein Lipase in Rat Brown Adipose Tissue during Acclimation to Cold". *The American Journal of Physiology* 246 (4 Pt 1): E327-333. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.246.4.E327>.
- Caron, Alexandre, Sébastien M. Labbé, Sophie Carter, Marie-Claude Roy, Roger Lecomte, Daniel Ricquier, Frédéric Picard, a Denis Richard. 2017. „Loss of UCP2 Impairs Cold-Induced Non-Shivering Thermogenesis by Promoting a Shift toward Glucose Utilization in Brown Adipose Tissue". *Biochimie* 134 (březen):118–26. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.006>.
- *Cinti, Saverio. 2008. „Reversible Transdifferentiation in the Adipose Organ". *International Journal of Pediatric Obesity*, leden. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17477160802404665>.
- Cinti. 2009. „Transdifferentiation Properties of Adipocytes in the Adipose Organ". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, listopad. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00183.2009>.
- Cline, G. W., A. J. Vidal-Puig, S. Dufour, K. S. Cadman, B. B. Lowell, a G. I. Shulman. 2001. „In Vivo Effects of Uncoupling Protein-3 Gene Disruption on Mitochondrial Energy

- Metabolism". *The Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20240–44.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102540200>.
- *Coleman, Rosalind A, a Douglas P Lee. 2004. „Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation". *Progress in Lipid Research* 43 (2): 134–76.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00051-1).
- Collins, S., K. W. Daniel, A. E. Petro, a R. S. Surwit. 1997. „Strain-Specific Response to Beta 3-Adrenergic Receptor Agonist Treatment of Diet-Induced Obesity in Mice". *Endocrinology* 138 (1): 405–13. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4829>.
- Cooney, G. J., G. S. Denyer, A. B. Jenkins, L. H. Storlien, E. W. Kraegen, a I. D. Caterson. 1993. „In Vivo Insulin Sensitivity of the Pyruvate Dehydrogenase Complex in Tissues of the Rat". *The American Journal of Physiology* 265 (1 Pt 1): E102–107.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.265.1.E102>.
- *Cottam, Daniel R., Samer G. Mattar, Emma Barinas-Mitchell, George Eid, Lewis Kuller, David E. Kelley, a Philip R. Schauer. 2004. „The Chronic Inflammatory Hypothesis for the Morbidity Associated with Morbid Obesity: Implications and Effects of Weight Loss". *Obesity Surgery* 14 (5): 589–600.
<https://doi.org/10.1381/096089204323093345>.
- Cousin, B., S. Cinti, M. Morroni, S. Raimbault, D. Ricquier, L. Pénicaud, a L. Casteilla. 1992. „Occurrence of Brown Adipocytes in Rat White Adipose Tissue: Molecular and Morphological Characterization". *Journal of Cell Science* 103 (4): 931–42.
<https://doi.org/10.1242/jcs.103.4.931>.
- Cowley, Michael A., James L. Smart, Marcelo Rubinstein, Marcelo G. Cerdán, Sabrina Diano, Tamas L. Horvath, Roger D. Cone, a Malcolm J. Low. 2001. „Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus". *Nature* 411 (6836): 480–84. <https://doi.org/10.1038/35078085>.
- Curat, Cyrille A., Alexandra Miranville, Coralie Sengenès, Michael Diehl, Carolin Tonus, Rudi Busse, a Anne Bouloumié. 2004. „From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes". *Diabetes* 53 (5): 1285–92. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1285>.
- Daikoku, Takiko, Yasuo Shinohara, Atsushi Shima, Naoshi Yamazaki, a Hiroshi Terada. 1997. „Dramatic enhancement of the specific expression of the heart-type fatty acid binding protein in rat brown adipose tissue by cold exposure". *FEBS Letters* 410 (2): 383–86.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00619-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00619-4).
- Daikoku, Takiko. 2000. „Specific elevation of transcript levels of particular protein subtypes induced in brown adipose tissue by cold exposure". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1457 (3): 263–72. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00107-9).
- *Das, Undurti N. 2006. „Essential Fatty Acids: Biochemistry, Physiology and Pathology". *Biotechnology Journal* 1 (4): 420–39. <https://doi.org/10.1002/biot.200600012>.
- Davies, Stephen P., Nicholas R. Helps, Patricia T. W. Cohen, a D. Grahame Hardie. 1995. „5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2Ca and native bovine protein phosphatase-2Ac". *FEBS Letters* 377 (3): 421–25. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01368-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01368-7).
- DeRuisseau, L.R., A.D. Parsons, a J.M. Overton. 2004. „Adaptive Thermogenesis Is Intact in B6 and A/J Mice Studied at Thermoneutrality". *Metabolism* 53 (11): 1417–23.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.06.007>.
- Divakaruni, Ajit S., Dickon M. Humphrey, a Martin D. Brand. 2012. „Fatty Acids Change the Conformation of Uncoupling Protein 1 (UCP1) *". *Journal of Biological Chemistry* 287 (44): 36845–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381780>.

- Edwards, Michael, a Shamim S. Mohiuddin. 2025. „Biochemistry, Lipolysis". In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560564/>.
- Elia, M., C. Zed, G. Neale, a G. Livesey. 1987. „The energy cost of triglyceride-fatty acid recycling in nonobese subjects after an overnight fast and four days of starvation". *Metabolism* 36 (3): 251–55. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(87\)90184-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90184-3).
- Essen, Gabriella von, Erik Lindsund, Barbara Cannon, a Jan Nedergaard. 2017. „Adaptive Facultative Diet-Induced Thermogenesis in Wild-Type but Not in UCP1-Ablated Mice". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 313 (5): E515–27. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00097.2017>.
- Febbraio, Maria, Nada A. Abumrad, David P. Hajjar, Kavita Sharma, Wanli Cheng, S. Frieda A. Pearce, a Roy L. Silverstein. 1999. „A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism". *Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 19055–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19055>.
- *Fenzl, Anna, a Florian W. Kiefer. 2014. „Brown Adipose Tissue and Thermogenesis". *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 19 (1): 25–37. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0022>.
- Festuccia, W. T. L., R. Guerra-Sá, N. H. Kawashita, M. a. R. Garófalo, E. A. Evangelista, V. Rodrigues, I. C. Kettelhut, a R. H. Migliorini. 2003. „Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284 (6): R1536–41. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00764.2002>.
- Festuccia, William T., Pierre-Gilles Blanchard, Véronique Turcotte, Mathieu Laplante, Meltem Sariahmetoglu, David N. Brindley, Denis Richard, a Yves Deshaies. 2009. „The PPARgamma Agonist Rosiglitazone Enhances Rat Brown Adipose Tissue Lipogenesis from Glucose without Altering Glucose Uptake". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296 (5): R1327–1335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91012.2008>.
- Fredrikson, G., a P. Belfrage. 1983. „Positional Specificity of Hormone-Sensitive Lipase from Rat Adipose Tissue". *The Journal of Biological Chemistry* 258 (23): 14253–56.
- Fredriksson, J. Magnus, a Jan Nedergaard. 2002. „Norepinephrine Specifically Stimulates Ribonucleotide Reductase Subunit R2 Gene Expression in Proliferating Brown Adipocytes: Mediation via a cAMP/PKA Pathway Involving Src and Erk1/2 Kinases". *Experimental Cell Research* 274 (2): 207–15. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5470>.
- Frontini, Andrea, Alessandra Vitali, Jessica Perugini, Incoronata Murano, Chiara Romiti, Daniel Ricquier, Mario Guerrieri, a Saverio Cinti. 2013. „White-to-Brown Transdifferentiation of Omental Adipocytes in Patients Affected by Pheochromocytoma". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (5): 950–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.005>.
- Fujimoto, Yusuke, Osamu Hashimoto, Daichi Shindo, Makoto Sugiyama, Shozo Tomonaga, Masaru Murakami, Tohru Matsui, a Masayuki Funaba. 2019. „Metabolic Changes in Adipose Tissues in Response to β_3 -adrenergic Receptor Activation in Mice". *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (1): 821–35. <https://doi.org/10.1002/jcb.27443>.
- Fukuhara, Atsunori, Morihiro Matsuda, Masako Nishizawa, Katsumori Segawa, Masaki Tanaka, Kae Kishimoto, Yasushi Matsuki, et al. 2005. „Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin". *Science* 307 (5708): 426–30. <https://doi.org/10.1126/science.1097243>.
- Gaudry, Michael J., Martin Jastroch, Jason R. Treberg, Michael Hofreiter, Johanna L. A. Paijmans, James Starrett, Nathan Wales, Anthony V. Signore, Mark S. Springer, a Kevin L. Campbell. 2017. „Inactivation of thermogenic UCP1 as a historical

- contingency in multiple placental mammal clades". *Science Advances* 3 (7): e1602878. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602878>.
- GBD 2015 Obesity Collaborators, Ashkan Afshin, Mohammad H. Forouzanfar, Marissa B. Reitsma, Patrick Sur, Kara Estep, Alex Lee, et al. 2017. „Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years". *The New England Journal of Medicine* 377 (1): 13–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>.
- Gong, Da-Wei, Shadi Monemdjou, Oksana Gavrilova, Lisa R. Leon, Bernice Marcus-Samuels, Chieh J. Chou, Carrie Everett, et al. 2000. „Lack of Obesity and Normal Response to Fasting and Thyroid Hormone in Mice Lacking Uncoupling Protein-3*". *Journal of Biological Chemistry* 275 (21): 16251–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910177199>.
- Granneman, James G., Hsiao-Ping H. Moore, Rachel L. Granneman, Andrew S. Greenberg, Martin S. Obin, a Zhengxian Zhu. 2007. „Analysis of Lipolytic Protein Trafficking and Interactions in Adipocytes*". *Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5726–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610580200>.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, a C. Londos. 1991. „Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets". *Journal of Biological Chemistry* 266 (17): 11341–46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99168-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99168-4).
- Grefhorst, Aldo, Johanna C. van den Beukel, Wieneke Dijk, Jacobie Steenbergen, Gardi J. Voortman, Selmar Leeuwenburgh, Theo J. Visser, et al. 2018. „Multiple Effects of Cold Exposure on Livers of Male Mice". *The Journal of Endocrinology* 238 (2): 91–106. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0076>.
- Han, Tim Tian Y., Sandra Toutounji, Brian G. Amsden, a Lauren E. Flynn. 2015. „Adipose-derived stromal cells mediate *in vivo* adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds". *Biomaterials* 72 (prosinec):125–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.053>.
- Hao, Qin, Rachita Yadav, Astrid L. Basse, Sidsel Petersen, Si B. Sonne, Simon Rasmussen, Qianhua Zhu, et al. 2015. „Transcriptome Profiling of Brown Adipose Tissue during Cold Exposure Reveals Extensive Regulation of Glucose Metabolism". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 308 (5): E380–92. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00277.2014>.
- *Harms, Matthew, a Patrick Seale. 2013. „Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential". *Nature Medicine* 19 (10): 1252–63. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>.
- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, M.C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli, a S. Cinti. 2000. „Multilocular Fat Cells in WAT of CL-316243-Treated Rats Derive Directly from White Adipocytes". 2000. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C670>.
- Himms-Hagen, Jean. 1990. „Brown Adipose Tissue Thermogenesis: Interdisciplinary Studies". *The FASEB Journal* 4 (11): 2890–98. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.11.2199286>.
- Hotamisligil, Gökhan S., Randall S. Johnson, Robert J. Distel, Ramsey Ellis, Virginia E. Papaioannou, a Bruce M. Spiegelman. 1996. „Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein". *Science* 274 (5291): 1377–79. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1377>.
- Hsieh, A. C. L., a L. D. Carlson. 1957. „Role of Adrenaline and Noradrenaline in Chemical Regulation of Heat Production". *American Journal of Physiology-Legacy Content* 190 (2): 243–46. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1957.190.2.243>.

- Chegary, Malika, Heleen te Brinke, Jos P. N. Ruiter, Frits A. Wijburg, Maria S. K. Stoll, Paul E. Minkler, Michel van Weeghel, et al. 2009. „Mitochondrial long chain fatty acid β -oxidation in man and mouse". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (8): 806–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.05.006>.
- Chen, Hubert C., Steven J. Smith, Zuleika Ladha, Dalan R. Jensen, Luis D. Ferreira, Leslie K. Pulawa, James G. McGuire, Robert E. Pitas, Robert H. Eckel, a Robert V. Farese. 2002. „Increased Insulin and Leptin Sensitivity in Mice Lacking Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1". *The Journal of Clinical Investigation* 109 (8): 1049–55. <https://doi.org/10.1172/JCI14672>.
- Chen, Kong Y., Robert J. Brychta, Joyce D. Linderman, Sheila Smith, Amber Courville, William Dieckmann, Peter Herscovitch, et al. 2013. „Brown Fat Activation Mediates Cold-Induced Thermogenesis in Adult Humans in Response to a Mild Decrease in Ambient Temperature". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (7): E1218-1223. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4213>.
- *Cheong, Lai Yee, a Aimin Xu. 2021. „Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Browning of White Adipose Tissue: Molecular Mechanism and Therapeutic Complications". *Journal of Molecular Cell Biology* 13 (7): 466–79. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab038>.
- Chitraju, Chandramohan, Alexander W. Fischer, Robert V. Farese, a Tobias C. Walther. 2020. „Lipid Droplets in Brown Adipose Tissue Are Dispensable for Cold-Induced Thermogenesis". *Cell Reports* 33 (5): 108348. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108348>.
- Chomiki, Nathalie, John C. Voss, a Craig H. Warden. 2001. „Structure–Function Relationships in UCP1, UCP2 and Chimeras". *European Journal of Biochemistry* 268 (4): 903–13. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01946.x>.
- Chondronikola, Maria, Elena Volpi, Elisabet Børsheim, Craig Porter, Manish K. Saraf, Palam Annamalai, Christina Yfanti, et al. 2016. „Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans". *Cell Metabolism* 23 (6): 1200–1206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.029>.
- Choo, J. J. 2003. „Green Tea Reduces Body Fat Accretion Caused by High-Fat Diet in Rats through Beta-Adrenoceptor Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue". *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14 (11): 671–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.08.005>.
- Ikeda, Kenji, Qianqian Kang, Takeshi Yoneshiro, Joao Paulo Camporez, Hiroko Maki, Mayu Homma, Kosaku Shinoda, et al. 2017. „UCP1-Independent Signaling Involving SERCA2b-Mediated Calcium Cycling Regulates Beige Fat Thermogenesis and Systemic Glucose Homeostasis". *Nature Medicine* 23 (12): 1454–65. <https://doi.org/10.1038/nm.4429>.
- Iwase, Mari, Soshi Tokiwa, Shigeto Seno, Takako Mukai, Yu-Sheng Yeh, Haruya Takahashi, Wataru Nomura, et al. 2020. „Glycerol Kinase Stimulates Uncoupling Protein 1 Expression by Regulating Fatty Acid Metabolism in Beige Adipocytes". *Journal of Biological Chemistry* 295 (20): 7033–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011658>.
- Janovska, Petra, Petr Zouhar, Kristina Bardova, Jakub Otahal, Marek Vrbacky, Tomas Mracek, Katerina Adamcova, et al. 2023. „Impairment of adrenergically-regulated thermogenesis in brown fat of obesity-resistant mice is compensated by non-shivering thermogenesis in skeletal muscle". *Molecular Metabolism* 69 (březen):101683. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101683>.
- Joel, Cliffe D., a Eric G. Ball. 1962. „The Electron Transmitter System of Brown Adipose Tissue". *Biochemistry* 1 (2): 281–87. <https://doi.org/10.1021/bi00908a015>.

- Jump, D. B., S. D. Clarke, A. Thelen, a M. Liimatta. 1994. „Coordinate Regulation of Glycolytic and Lipogenic Gene Expression by Polyunsaturated Fatty Acids". *Journal of Lipid Research* 35 (6): 1076–84.
- Jung, Su Myung, Joan Sanchez-Gurmaches, a David A Guertin. 2019. „Brown Adipose Tissue Development and Metabolism". *Handbook of experimental pharmacology* 251:3–36. https://doi.org/10.1007/164_2018_168.
- Karlsson, Marie, Juan A. Contreras, Ulf Hellman, Hans Tornqvist, a Cecilia Holm. 1997. „cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase: EVOLUTIONARY RELATIONSHIP TO ESTERASES, LYSOPHOSPHOLIPASES, AND HALOPEROXIDASES*". *Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 27218–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27218>.
- Kazak, Lawrence, Edward T. Chouchani, Mark P. Jedrychowski, Brian K. Erickson, Kosaku Shinoda, Paul Cohen, Ramalingam Vetrivelan, et al. 2015. „A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat". *Cell* 163 (3): 643–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035>.
- Kim, Jason K., Oksana Gavrilova, Yan Chen, Marc L. Reitman, a Gerald I. Shulman. 2000. „Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice". *Journal of Biological Chemistry* 275 (12): 8456–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8456>.
- Knittle, J. L., K. Timmers, F. Ginsberg-Fellner, R. E. Brown, a D. P. Katz. 1979. „The Growth of Adipose Tissue in Children and Adolescents. Cross-Sectional and Longitudinal Studies of Adipose Cell Number and Size." *The Journal of Clinical Investigation* 63 (2): 239–46. <https://doi.org/10.1172/JCI109295>.
- Korobkina, Ekaterina D., Camila Martinez Calejman, John A. Haley, Miranda E. Kelly, Huawei Li, Maria Gaughan, Qingbo Chen, et al. 2024. „Brown Fat ATP-Citrate Lyase Links Carbohydrate Availability to Thermogenesis and Guards against Metabolic Stress". *Nature Metabolism* 6 (11): 2187–2202. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01143-3>.
- Kotzbeck, Petra, Antonio Giordano, Eleonora Mondini, Incoronata Murano, Ilenia Severi, Wiebe Venema, Maria Paola Cecchini, et al. 2018. „Brown Adipose Tissue Whitening Leads to Brown Adipocyte Death and Adipose Tissue Inflammation". *Journal of Lipid Research* 59 (5): 784–94. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>.
- *Kozak, Leslie P. 2010. „Brown Fat and the Myth of Diet-Induced Thermogenesis". *Cell Metabolism* 11 (4): 263–67. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.009>.
- Kus, Vladimir, Tomas Prazak, Petr Brauner, Michal Hensler, Ondrej Kuda, Pavel Flachs, Petra Janovska, et al. 2008. „Induction of Muscle Thermogenesis by High-Fat Diet in Mice: Association with Obesity-Resistance". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (2): E356-367. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90256.2008>.
- Labbé, Sébastien M., Alexandre Caron, Inan Bakan, Mathieu Laplante, André C. Carpentier, Roger Lecomte, a Denis Richard. 2015. „In Vivo Measurement of Energy Substrate Contribution to Cold-induced Brown Adipose Tissue Thermogenesis". *The FASEB Journal* 29 (5): 2046–58. <https://doi.org/10.1096/fj.14-266247>.
- Labbé, Sébastien M., Mathilde Mouchiroud, Alexandre Caron, Blandine Secco, Elizaveta Freinkman, Guillaume Lamoureux, Yves Gélinas, et al. 2016. „mTORC1 Is Required for Brown Adipose Tissue Recruitment and Metabolic Adaptation to Cold". *Scientific Reports* 6 (1): 37223. <https://doi.org/10.1038/srep37223>.
- Lafontan, Max, a Dominique Langin. 2009. „Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue". *Progress in Lipid Research* 48 (5): 275–97. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>.

- Lass, Achim, Robert Zimmermann, Guenter Haemmerle, Monika Riederer, Gabriele Schoiswohl, Martina Schweiger, Petra Kienesberger, Juliane G. Strauss, Gregor Gorkiewicz, a Rudolf Zechner. 2006. „Adipose Triglyceride Lipase-Mediated Lipolysis of Cellular Fat Stores Is Activated by CGI-58 and Defective in Chanarin-Dorfman Syndrome". *Cell Metabolism* 3 (5): 309–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>.
- Lervik, Anders, Fernando Bresme, Signe Kjelstrup, a J. Miguel Rubí. 2012. „On the Thermodynamic Efficiency of Ca²⁺-ATPase Molecular Machines". *Biophysical Journal* 103 (6): 1218–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.057>.
- *Li, Yongguo, a Tobias Fromme. 2022. „Uncoupling Protein 1 Does Not Produce Heat without Activation". *International Journal of Molecular Sciences* 23 (5): 2406. <https://doi.org/10.3390/ijms23052406>.
- Lin, S., T. C. Thomas, L. H. Storlien, a X. F. Huang. 2000. „Development of High Fat Diet-Induced Obesity and Leptin Resistance in C57Bl/6J Mice". *International Journal of Obesity* 24 (5): 639–46. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801209>.
- Lindquist, Johanna M., a Stefan Rehnmark. 1998. „Ambient Temperature Regulation of Apoptosis in Brown Adipose Tissue: Erk1/2 PROMOTES NOREPINEPHRINE-DEPENDENT CELL SURVIVAL*". *Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30147–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30147>.
- Longo, Nicola, Cristina Amat Di San Filippo, a Marzia Pasquali. 2006. „Disorders of Carnitine Transport and the Carnitine Cycle". *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 142C (2): 77–85. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30087>.
- *Loos, R. J. F., a C. Bouchard. 2003. „Obesity – Is It a Genetic Disorder?" *Journal of Internal Medicine* 254 (5): 401–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01242.x>.
- *Luna-Luna, María, Aida Medina-Urrutia, Gilberto Vargas-Alarcón, Fernanda Coss-Rovirosa, Jesús Vargas-Barrón, a Óscar Pérez-Méndez. 2015. „Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis". *Archives of Medical Research* 46 (5): 392–407. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.007>.
- Marette, A, a L J Bukowiecki. 1991. „Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis. Evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport." *Biochemical Journal* 277 (Pt 1): 119–24.
- Matsuo, T., M. Komuro, a M. Suzuki. 1996. „Beef Tallow Diet Decreases Uncoupling Protein Content in the Brown Adipose Tissue of Rats". *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 42 (6): 595–601. <https://doi.org/10.3177/jnsv.42.595>.
- Matsuo, T., Y. Shimomura, S. Saitoh, K. Tokuyama, H. Takeuchi, a M. Suzuki. 1995. „Sympathetic Activity Is Lower in Rats Fed a Beef Tallow Diet than in Rats Fed a Safflower Oil Diet". *Metabolism: Clinical and Experimental* 44 (7): 934–39. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90248-1](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90248-1).
- Matthias, A., K. B. Ohlson, J. M. Fredriksson, A. Jacobsson, J. Nedergaard, a B. Cannon. 2000. „Thermogenic Responses in Brown Fat Cells Are Fully UCP1-Dependent. UCP2 or UCP3 Do Not Substitute for UCP1 in Adrenergically or Fatty Acid-Induced Thermogenesis". *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33): 25073–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000547200>.
- Mercer, Stewart W., a Paul Trayhurn. 1987. „Effect of High Fat Diets on Energy Balance and Thermogenesis in Brown Adipose Tissue of Lean and Genetically Obese *ob/ob* Mice". *The Journal of Nutrition* 117 (12): 2147–53. <https://doi.org/10.1093/jn/117.12.2147>.

- Milner, R. E., a P. Trayhurn. 1989. „Cold-Induced Changes in Uncoupling Protein and GDP Binding Sites in Brown Fat of Ob/Ob Mice". *The American Journal of Physiology* 257 (2 Pt 2): R292-299. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R292>.
- Morrisette, Jeffery M., Jens P. G. Franck, a Barbara A. Block. 2003. „Characterization of Ryanodine Receptor and Ca²⁺-ATPase Isoforms in the Thermogenic Heater Organ of Blue Marlin (*Makaira nigricans*)". *The Journal of Experimental Biology* 206 (Pt 5): 805–12. <https://doi.org/10.1242/jeb.00158>.
- Mouisel, Etienne, Anaïs Bodon, Christophe Noll, Stéphanie Cassant-Sourdy, Marie-Adeline Marques, Remy Flores-Flores, Elodie Riant, et al. 2025. „Cold-induced thermogenesis requires neutral-lipase-mediated intracellular lipolysis in brown adipocytes". *Cell Metabolism* 37 (2): 429-440.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.10.018>.
- Müller, Sebastian, Miroslav Balaz, Patrik Stefanicka, Lukas Varga, Ez-Zoubir Amri, Jozef Ukropec, Bernd Wollscheid, a Christian Wolfrum. 2016. „Proteomic Analysis of Human Brown Adipose Tissue Reveals Utilization of Coupled and Uncoupled Energy Expenditure Pathways". *Scientific Reports* 6 (1): 30030. <https://doi.org/10.1038/srep30030>.
- Nakazato, Masamitsu, Noboru Murakami, Yukari Date, Masayasu Kojima, Hisayuki Matsuo, Kenji Kangawa, a Shigeru Matsukura. 2001. „A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding". *Nature* 409 (6817): 194–98. <https://doi.org/10.1038/35051587>.
- Nedergaard, J., S. Alexson, a B. Cannon. 1980. „Cold Adaptation in the Rat: Increased Brown Fat Peroxisomal Beta-Oxidation Relative to Maximal Mitochondrial Oxidative Capacity". *The American Journal of Physiology* 239 (5): C208-216. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1980.239.5.C208>.
- Né Chad, M., J. Nedergaard, a B. Cannon. 1987. „Noradrenergic Stimulation of Mitochondriogenesis in Brown Adipocytes Differentiating in Culture". *The American Journal of Physiology* 253 (6 Pt 1): C889-894. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.6.C889>.
- Nishina, P. M., J. Wang, W. Toyofuku, F. A. Kuypers, B. Y. Ishida, a B. Paigen. 1993. „Atherosclerosis and Plasma and Liver Lipids in Nine Inbred Strains of Mice". *Lipids* 28 (7): 599–605. <https://doi.org/10.1007/BF02536053>.
- Nye, Colleen K., Richard W. Hanson, a Satish C. Kalhan. 2008. „Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis *in Vivo* in the Rat". *Journal of Biological Chemistry* 283 (41): 27565–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804393200>.
- Oeckl, Josef, Petra Janovska, Katerina Adamcova, Kristina Bardova, Sarah Brunner, Sebastian Dieckmann, Josef Ecker, et al. 2022. „Loss of UCP1 function augments recruitment of futile lipid cycling for thermogenesis in murine brown fat". *Molecular Metabolism* 61 (červenec):101499. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101499>.
- Ohtomo, Takayuki, Kanako Ino, Ryota Miyashita, Maya Chigira, Masahiko Nakamura, Koji Someya, Niro Inaba, Mariko Fujita, Mitsuhiro Takagi, a Junji Yamada. 2017. „Chronic high-fat feeding impairs adaptive induction of mitochondrial fatty acid combustion-associated proteins in brown adipose tissue of mice". *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (únor):32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.002>.
- Orava, Janne, Pirjo Nuutila, Martin E. Lidell, Vesa Oikonen, Tommi Noponen, Tapio Viljanen, Mika Scheinin, et al. 2011. „Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin". *Cell Metabolism* 14 (2): 272–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.012>.
- Ott, M. O., E. Bober, G. Lyons, H. Arnold, a M. Buckingham. 1991. „Early Expression of the Myogenic Regulatory Gene, Myf-5, in Precursor Cells of Skeletal Muscle in the

- Mouse Embryo". *Development (Cambridge, England)* 111 (4): 1097–1107.
<https://doi.org/10.1242/dev.111.4.1097>.
- Ouellet, Véronique, Sébastien M. Labbé, Denis P. Blondin, Serge Phoenix, Brigitte Guérin, François Haman, Eric E. Turcotte, Denis Richard, a André C. Carpentier. 2012. „Brown Adipose Tissue Oxidative Metabolism Contributes to Energy Expenditure during Acute Cold Exposure in Humans". *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 545–52. <https://doi.org/10.1172/JCI60433>.
- Panic, Vanja, Stephanie Pearson, James Banks, Trevor S. Tippetts, Jesse N. Velasco-Silva, Sanghoon Lee, Judith Simcox, et al. 2020. „Mitochondrial Pyruvate Carrier Is Required for Optimal Brown Fat Thermogenesis". *eLife* 9 (srpen):e52558.
<https://doi.org/10.7554/eLife.52558>.
- Petrovic, Natasa, Tomas B. Walden, Irina G. Shabalina, James A. Timmons, Barbara Cannon, a Jan Nedergaard. 2010. „Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes". *The Journal of Biological Chemistry* 285 (10): 7153–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942>.
- Reidy, Shannon P., a Jean-Michel Weber. 2002. „Accelerated Substrate Cycling: A New Energy-Wasting Role for Leptin in Vivo". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282 (2): E312–17.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00037.2001>.
- Riis-Vestergaard, Mette Ji, Bjørn Richelsen, Jens Meldgaard Bruun, Wei Li, Jacob B Hansen, a Steen Bønløkke Pedersen. 2020. „Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105 (4): e994–1005.
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgz298>.
- Ronchi, Juliana A., Tiago R. Figueira, Felipe G. Ravagnani, Helena C. F. Oliveira, Anibal E. Vercesi, a Roger F. Castilho. 2013. „A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities". *Free Radical Biology and Medicine* 63 (říjen):446–56.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049>.
- Rosenwald, Matthias, Alik Perdikari, Thomas Rüllicke, a Christian Wolfrum. 2013. „Bi-Directional Interconversion of Brite and White Adipocytes". *Nature Cell Biology* 15 (6): 659–67. <https://doi.org/10.1038/ncb2740>.
- Ruzickova, Jana, Martin Rossmeisl, Tomas Prazak, Pavel Flachs, Jana Sponarova, Marek Veck, Eva Tvrzicka, Morten Bryhn, a Jan Kopecky. 2004. „Omega-3 PUFA of Marine Origin Limit Diet-Induced Obesity in Mice by Reducing Cellularity of Adipose Tissue". *Lipids* 39 (12): 1177–85. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1345-9>.
- Sadurskis, A., A. Dicker, B. Cannon, a J. Nedergaard. 1995. „Polyunsaturated Fatty Acids Recruit Brown Adipose Tissue: Increased UCP Content and NST Capacity". *The American Journal of Physiology* 269 (2 Pt 1): E351–360.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.2.E351>.
- Saito, Masayuki, Yuko Okamatsu-Ogura, Mami Matsushita, Kumiko Watanabe, Takeshi Yoneshiro, Junko Nio-Kobayashi, Toshihiko Iwanaga, et al. 2009. „High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans". *Diabetes* 58 (7): 1526–31. <https://doi.org/10.2337/db09-0530>.
- Sale, E. M., a R. M. Denton. 1985. „Adipose-Tissue Phosphofructokinase. Rapid Purification and Regulation by Phosphorylation in Vitro". *The Biochemical Journal* 232 (3): 897–904. <https://doi.org/10.1042/bj2320897>.

- Sanchez-Gurmaches, Joan, Yuefeng Tang, Naja Zenius Jespersen, Martina Wallace, Camila Martinez Calejman, Sharvari Gujja, Huawei Li, et al. 2018. „Brown fat AKT2 is a cold-induced kinase that stimulates ChREBP-mediated de novo lipogenesis to optimize fuel storage and thermogenesis". *Cell metabolism* 27 (1): 195-209.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.008>.
- Seale, Patrick, Bryan Bjork, Wenli Yang, Shingo Kajimura, Sherry Chin, Shihuan Kuang, Anthony Scimè, et al. 2008. „PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch". *Nature* 454 (7207): 961–67. <https://doi.org/10.1038/nature07182>.
- Senga, Shogo, Narumi Kobayashi, Koichiro Kawaguchi, Akira Ando, a Hiroshi Fujii. 2018. „Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling in cancer cells". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (9): 1057–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.010>.
- Sengenès, Coralie, Anne Bouloumie, Hans Hauner, Michel Berlan, Rudi Busse, Max Lafontan, a Jean Galitzky. 2003. „Involvement of a cGMP-Dependent Pathway in the Natriuretic Peptide-Mediated Hormone-Sensitive Lipase Phosphorylation in Human Adipocytes". *The Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 48617–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303713200>.
- Sengenès, Coralie, Alexia Zakaroff-Girard, Agnès Moulin, Michel Berlan, Anne Bouloumié, Max Lafontan, a Jean Galitzky. 2002. „Natriuretic Peptide-Dependent Lipolysis in Fat Cells Is a Primate Specificity". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283 (1): R257–65. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00453.2001>.
- Shackney, Stanley E., a Cliffe D. Joel. 1966. „Stimulation of Glucose Metabolism in Brown Adipose Tissue by Addition of Insulin *in Vitro*". *Journal of Biological Chemistry* 241 (17): 4004–10. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99803-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99803-0).
- *Sharma, Anand Kumar, Radhika Khandelwal, a Christian Wolfrum. 2024. „Futile cycles: Emerging utility from apparent futility". *Cell Metabolism* 36 (6): 1184–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.03.008>.
- Shi, Yufeng, Honglei Zhai, Sharon John, Yi-Ting Shen, Yali Ran, Giang Hoang, a Miao-Hsueh Chen. 2021. „Gene Expression Analysis of Environmental Temperature and High-Fat Diet-Induced Changes in Mouse Supraclavicular Brown Adipose Tissue". *Cells* 10 (6): 1370. <https://doi.org/10.3390/cells10061370>.
- Shimizu, Y., H. Nikami, K. Tsukazaki, U. F. Machado, H. Yano, Y. Seino, a M. Saito. 1993. „Increased Expression of Glucose Transporter GLUT-4 in Brown Adipose Tissue of Fasted Rats after Cold Exposure". *The American Journal of Physiology* 264 (6 Pt 1): E890-895. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.6.E890>.
- Shin, Hyunsu, Yinyan Ma, Tatyana Chanturiya, Qiang Cao, Youlin Wang, Anil K.G. Kadegowda, Rachel Jackson, et al. 2017. „Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice". *Cell Metabolism* 26 (5): 764-777.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.002>.
- Shirkhani, Samaneh, Sayed Mohammad Marandi, Fatemeh Kazeminasab, Maryam Esmaeili, Kamran Ghaedi, Fahimeh Esfarjani, Hanieh Shiralian-Esfahani, a Mohammad Hossein Nasr-Esfahani. 2018. „Comparative Studies on the Effects of High-Fat Diet, Endurance Training and Obesity on Ucp1 Expression in Male C57BL/6 Mice". *Gene* 676 (listopad):16–21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.015>.
- Schlein, Christian, Alexander W. Fischer, Frederike Sass, Anna Worthmann, Klaus Tödter, Michelle Y. Jaekstein, Janina Behrens, et al. 2021. „Endogenous Fatty Acid Synthesis Drives Brown Adipose Tissue Involution". *Cell Reports* 34 (2): 108624. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108624>.

- *Schönfeld, Peter, a Lech Wojtczak. 2016. „Short- and Medium-Chain Fatty Acids in Energy Metabolism: The Cellular Perspective". *Journal of Lipid Research* 57 (6): 943–54. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>.
- Schweiger, Martina, Renate Schreiber, Guenter Haemmerle, Achim Lass, Christian Fledelius, Poul Jacobsen, Hans Tornqvist, Rudolf Zechner, a Robert Zimmermann. 2006. „Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-Sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism". *The Journal of Biological Chemistry* 281 (52): 40236–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608048200>.
- Sklioutovskaya-Lopez, Kristiana, Jacaline Parkman, a Jung Han Kim. 2019. „Ucp1 and Metabolism-Related Gene Expression Response to High Fat Diets in Brown Adipose Tissue of TALLYHO/JngJ vs. C57BL/6J Mice". *Proceedings of the West Virginia Academy of Science* 91 (1). <https://doi.org/10.55632/pwvas.v91i1.579>.
- Smith, Robert E. 1964. „Brown Fat in the Rat: Adaptive Changes in Cold". *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 9 (1): 187–96. <https://doi.org/10.1007/BF01610032>.
- Smith, S. J., S. Cases, D. R. Jensen, H. C. Chen, E. Sande, B. Tow, D. A. Sanan, J. Raber, R. H. Eckel, a R. V. Farese. 2000. „Obesity Resistance and Multiple Mechanisms of Triglyceride Synthesis in Mice Lacking Dgat". *Nature Genetics* 25 (1): 87–90. <https://doi.org/10.1038/75651>.
- Smith, S., A. Stern, Z. I. Randhawa, a J. Knudsen. 1985. „Mammalian Fatty Acid Synthetase Is a Structurally and Functionally Symmetrical Dimer". *European Journal of Biochemistry* 152 (3): 547–55. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09230.x>.
- Solinas, Giovanni, Serge Summermatter, Davide Mainieri, Marcel Gubler, Luciano Pirola, Matthias P. Wymann, Sandro Rusconi, Jean-Pierre Montani, Josiane Seydoux, a Abdul G. Dulloo. 2004. „The direct effect of leptin on skeletal muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation". *FEBS Letters* 577 (3): 539–44. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.066>.
- Spalding, Kirsty L., Erik Arner, Pål O. Westermarck, Samuel Bernard, Bruce A. Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. „Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans". *Nature* 453 (7196): 783–87. <https://doi.org/10.1038/nature06902>.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, a M. A. Lazar. 2001. „The Hormone Resistin Links Obesity to Diabetes". *Nature* 409 (6818): 307–12. <https://doi.org/10.1038/35053000>.
- Stone, Scot J., Heather M. Myers, Steven M. Watkins, Barbara E. Brown, Kenneth R. Feingold, Peter M. Elias, a Robert V. Farese. 2004. „Lipopenia and Skin Barrier Abnormalities in DGAT2-deficient Mice". *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11767–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311000200>.
- Straat, Maaïke E., Carlijn A. Hoekx, Floris H.P. Van Velden, Lenka M. Pereira Arias-Bouda, Lauralyne Dumont, Denis P. Blondin, Mariëtte R. Boon, Borja Martinez-Tellez, a Patrick C.N. Rensen. 2023. „Stimulation of the Beta-2-Adrenergic Receptor with Salbutamol Activates Human Brown Adipose Tissue". *Cell Reports Medicine* 4 (2): 100942. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100942>.
- Surholt, Bernhard, Heinrich Greive, Thomas Baal, a Andreas Bertsch. 1991. „Warm-up and substrate cycling in flight muscles of male bumblebees, *Bombus terrestris*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 98 (2): 299–303. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90536-L](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90536-L).
- Surwit, R. S., M. N. Feinglos, J. Rodin, A. Sutherland, A. E. Petro, E. C. Opara, C. M. Kuhn, a M. Rebuffe-Scrive. 1995. „Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and

- AJ $\times$ J mice". *Metabolism* 44 (5): 645–51. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90123-X](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90123-X).
- Surwit, R. S., A. E. Petro, P. Parekh, a S. Collins. 1997. „Low Plasma Leptin in Response to Dietary Fat in Diabetes- and Obesity-Prone Mice". *Diabetes* 46 (9): 1516–20. <https://doi.org/10.2337/diab.46.9.1516>.
- Surwit, Richard S, Cynthia M Kuhn, Christina Cochrane, James A McCubbin, a Mark N Feinglos. 1988. „Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice". *Diabetes* 37 (9): 1163–67. <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>.
- Surwit, Richard S., Shiyang Wang, Ann E. Petro, Daniel Sanchis, Serge Raimbault, Daniel Ricquier, a Sheila Collins. 1998. „Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7): 4061–65.
- Sztalryd, Carole, Guoheng Xu, Heidi Dorward, John T. Tansey, Juan A. Contreras, Alan R. Kimmel, a Constantine Londos. 2003. „Perilipin A Is Essential for the Translocation of Hormone-Sensitive Lipase during Lipolytic Activation". *The Journal of Cell Biology* 161 (6): 1093–1103. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210169>.
- Takeuchi, H., T. Matsuo, K. Tokuyama, a M. Suzuki. 1996. „Effect of Dietary Fat Type on Beta-Oxidation of Brown Adipose Tissue and Na⁺ Channel Density of Brain Nerve Membrane in Rats". *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 42 (2): 161–66. <https://doi.org/10.3177/jnsv.42.161>.
- *Tavoulari, Sotiria, Maximilian Sichrovsky, a Edmund R. S. Kunji. 2023. „Fifty Years of the Mitochondrial Pyruvate Carrier: New Insights into Its Structure, Function, and Inhibition". *Acta Physiologica (Oxford, England)* 238 (4): e14016. <https://doi.org/10.1111/apha.14016>.
- Teodoro, J. S., P. Zouhar, P. Flachs, K. Bardova, P. Janovska, A. P. Gomes, F. V. Duarte, et al. 2014. „Enhancement of Brown Fat Thermogenesis Using Chenodeoxycholic Acid in Mice". *International Journal of Obesity* 38 (8): 1027–34. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.230>.
- Trayhurn, P. 1989. „Thermogenesis and the Energetics of Pregnancy and Lactation". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 67 (4): 370–75. <https://doi.org/10.1139/y89-060>.
- Trayhurn, Paul. 2017. „Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity". *Biochimie*, UCP1: 40 years and beyond, 134 (březen):62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.09.007>.
- Ueta, Cintia B, Gustavo W Fernandes, Luciane P Capelo, Tatiane L Fonseca, Flávia D'Angelo Maculan, Cecilia H A Gouveia, Patrícia C Brum, et al. 2012. „ β 1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice". *The Journal of endocrinology* 214 (3): 359–65. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0155>.
- Uchitomi, Ran, Yukino Hatazawa, Nanami Senoo, Kiyoshi Yoshioka, Mariko Fujita, Takahiko Shimizu, Shinji Miura, Yusuke Ono, a Yasutomi Kamei. 2019. „Metabolomic Analysis of Skeletal Muscle in Aged Mice". *Scientific Reports* 9 (1): 10425. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46929-8>.
- Vergnes, Laurent, Robert Chin, Stephen G. Young, a Karen Reue. 2011. „Heart-type Fatty Acid-binding Protein Is Essential for Efficient Brown Adipose Tissue Fatty Acid Oxidation and Cold Tolerance". *Journal of Biological Chemistry* 286 (1): 380–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184754>.
- Verkerke, Anthony R. P., Xu Shi, Mark Li, Yusuke Higuchi, Tadashi Yamamuro, Daisuke Katoh, Hiroshi Nishida, et al. 2024. „SLC25A48 Controls Mitochondrial Choline Import and Metabolism". *Cell Metabolism* 36 (9): 2156-2166.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.07.010>.

- Vernochet, Cecile, Sidney B. Peres, Kathryn E. Davis, Meghan E. McDonald, Li Qiang, Hong Wang, Philipp E. Scherer, a Stephen R. Farmer. 2009. „C/EBPalpha and the Corepressors CtBP1 and CtBP2 Regulate Repression of Select Visceral White Adipose Genes during Induction of the Brown Phenotype in White Adipocytes by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists". *Molecular and Cellular Biology* 29 (17): 4714–28. <https://doi.org/10.1128/MCB.01899-08>.
- Virtanen, Kirsi A., Martin E. Lidell, Janne Orava, Mikael Heglind, Rickard Westergren, Tarja Niemi, Markku Taittonen, et al. 2009. „Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults". *The New England Journal of Medicine* 360 (15): 1518–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>.
- Waller-Evans, Helen, Christophe Hue, Jane Fearnside, Alice R. Rothwell, Helen E. Lockstone, Sophie Caldérari, Steven P. Wilder, Jean-Baptiste Cazier, James Scott, a Dominique Gauguier. 2013. „Nutrigenomics of High Fat Diet Induced Obesity in Mice Suggests Relationships between Susceptibility to Fatty Liver Disease and the Proteasome". *PLOS ONE* 8 (12): e82825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082825>.
- *Wanders, Ronald J. A., a Joseph M. Tager. 1998. „Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease". *Molecular Aspects of Medicine* 19 (2): i–154. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(98\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(98)00003-X).
- Wang, Qiong, Shoufeng Li, Lei Jiang, Yunhua Zhou, Zi Li, Mengle Shao, Wenjun Li, a Yong Liu. 2010. „Deficiency in Hepatic ATP-Citrate Lyase Affects VLDL-Triglyceride Mobilization and Liver Fatty Acid Composition in Mice". *Journal of Lipid Research* 51 (9): 2516–26. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003335>.
- *Wang, Yu, Weixing Yu, Sha Li, Dingyuan Guo, Jie He, a Yugang Wang. 2022. „Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases". *Frontiers in Oncology* 12 (březen). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.836058>.
- Wang, Zhichao, Tinglu Ning, Anying Song, Jared Rutter, Qiong A. Wang, a Lei Jiang. 2020. „Chronic Cold Exposure Enhances Glucose Oxidation in Brown Adipose Tissue". *EMBO Reports* 21 (11): e50085. <https://doi.org/10.15252/embr.202050085>.
- Watson, P. M., S. P. Commins, R. J. Beiler, H. C. Hatcher, a T. W. Gettys. 2000. „Differential Regulation of Leptin Expression and Function in A/J vs. C57BL/6J Mice during Diet-Induced Obesity". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 279 (2): E356–365. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.2.E356>.
- *Williams, Kevin Jon. 2008. „Molecular Processes That Handle -- and Mishandle -- Dietary Lipids". *The Journal of Clinical Investigation* 118 (10): 3247–59. <https://doi.org/10.1172/JCI35206>.
- Wu, LiZhen, LinKang Zhou, Cheng Chen, JingYi Gong, Li Xu, Jing Ye, De Li, a Peng Li. 2014. „Cidea Controls Lipid Droplet Fusion and Lipid Storage in Brown and White Adipose Tissue". *Science China Life Sciences* 57 (1): 107–16. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4585-y>.
- Wu, Qiwei, Melissa Kazantzis, Holger Doege, Angelica M. Ortegon, Bernice Tsang, Alaric Falcon, a Andreas Stahl. 2006. „Fatty Acid Transport Protein 1 Is Required for Nonshivering Thermogenesis in Brown Adipose Tissue". *Diabetes* 55 (12): 3229–37. <https://doi.org/10.2337/db06-0749>.
- Xue, Kaili, Dongmei Wu, Yushuang Wang, Yiheng Zhao, Hongyu Shen, Jingfei Yao, Xun Huang, et al. 2022. „The Mitochondrial Calcium Uniporter Engages UCP1 to Form a Thermoprotector That Promotes Thermogenesis". *Cell Metabolism* 34 (9): 1325–1341.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.011>.
- Yamamoto, Takenori, Atsushi Yamamoto, Masahiro Watanabe, Taisuke Matsuo, Naoshi Yamazaki, Masatoshi Kataoka, Hiroshi Terada, a Yasuo Shinohara. 2009.

- „Classification of FABP Isoforms and Tissues Based on Quantitative Evaluation of Transcript Levels of These Isoforms in Various Rat Tissues". *Biotechnology Letters* 31 (11): 1695–1701. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0065-7>.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, et al. 2002. „Adiponectin Stimulates Glucose Utilization and Fatty-Acid Oxidation by Activating AMP-Activated Protein Kinase". *Nature Medicine* 8 (11): 1288–95. <https://doi.org/10.1038/nm788>.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, et al. 2001. „The Fat-Derived Hormone Adiponectin Reverses Insulin Resistance Associated with Both Lipodystrophy and Obesity". *Nature Medicine* 7 (8): 941–46. <https://doi.org/10.1038/90984>.
- Yamauchi, Toshimasa, Junji Kamon, Hironori Waki, Yasushi Imai, Nobuhiro Shimozawa, Kyouji Hioki, Shoko Uchida, et al. 2003. „Globular Adiponectin Protected ob/ob Mice from Diabetes and ApoE-deficient Mice from Atherosclerosis*". *Journal of Biological Chemistry* 278 (4): 2461–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209033200>.
- Yang, Xingyuan, Xin Lu, Marc Lombès, Geun Bae Rha, Young-In Chi, Theresa M. Guerin, Eric J. Smart, a Jun Liu. 2010. „The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase". *Cell Metabolism* 11 (3): 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.003>.
- Yoshida, Toshihide, Keiji Yoshioka, Yasuo Wakabayashi, Hitoshi Nishioka, a Motoharu Kondo. 1988. „Effects of Capsaicin and Isothiocyanate on Thermogenesis of Interscapular Brown Adipose Tissue in Rats." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 34 (6): 587–94. <https://doi.org/10.3177/jnsv.34.587>.
- Yu, Jinhai, Shuyan Zhang, Liujuan Cui, Weiyi Wang, Huimin Na, Xiaotong Zhu, Linghai Li, et al. 2015. „Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (5): 918–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.020>.
- Yu, Xing Xian, David A. Lewin, William Forrest, a Sean H. Adams. 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): 155–68. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0568com>.
- Zhang, C. Y., G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, et al. 2001. „Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and Is a Major Link between Obesity, Beta Cell Dysfunction, and Type 2 Diabetes". *Cell* 105 (6): 745–55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00378-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00378-6).
- Zhang, Yiying, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold, a Jeffrey M. Friedman. 1994. „Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue". *Nature* 372 (6505): 425–32. <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhou, Zhihong, Shen Yon Toh, Zhengming Chen, Ke Guo, Chee Peng Ng, Sathivel Ponniah, Sheng-Cai Lin, Wanjin Hong, a Peng Li. 2003. „Cidea-Deficient Mice Have Lean Phenotype and Are Resistant to Obesity". *Nature Genetics* 35 (1): 49–56. <https://doi.org/10.1038/ng1225>.
- Zhuo, Shixuan, Meijuan Bai, Zinan Wang, Lingling Chen, Zixuan Li, Xinyu Zhu, Jinzhu Chen, Xiaoyi Ye, Cheng Guo, a Yan Chen. 2024. „Glycogen Synthesis Is Required for Adaptive Thermogenesis in Beige Adipose Tissue and Affects Diet-Induced Obesity". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 326 (5): E696–708. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2024>.