

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. František Galatík

Mitochondriální respirace hnědé tukové tkáně v rozvoji chladové aklimace

Mitochondrial respiration of brown adipose tissue in development of cold acclimation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Daniela Horníková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 9. 8. 2021

Podpis:.....

Bc. František Galatík

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucí svojí práce doc. RNDr. Jitce Žurmanové Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost a rady, které mi pomohly ve vypracování všech částí práce. Dále bych chtěl poděkovat konzultantce RNDr. Daniele Horníkové Ph.D za praktické rady během experimentální části práce. Díky si zaslouží i další kolegové z laboratoře, Mgr. Petr Kašík a Mgr. Andrea Žbírková za pomoc během experimentů a za vytvoření příjemné atmosféry pro práci. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat RNDr. Barbaře Elsnicové Ph.D. za poskytnutí skvělých obrázku do této práce. Díky si samozřejmě zaslouží i moje přítelkyně Veronika a moje rodina, za jejich podporu a vytvoření zázemí nejenom během vypracovávání této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Historické experimenty zabývající se vlivem nízkých teplot prostředí na organismus byly často doprovázeny vývojem nežádoucích účinků. Naše laboratoř nedávno publikovala protokol chladové aklimace (5 týdnů v 8 ± 1 °C), který u potkanů navozuje kardioprotektivní fenotyp. Důležitým mechanismem chladové aklimace je aktivace a nárůst hnědé tukové tkáně. Kromě netřesové termogeneze dokáže hnědá tuková tkáň produkovat řadu autokrinních, parakrinních a endokrinních faktorů, které mohou pozitivně ovlivňovat systémový metabolismus a funkci ostatních důležitých orgánů. Vliv chladové aklimace na metabolismus hnědé tukové tkáně však není příliš dobře prozkoumán. Cílem této práce bylo změřit vybrané parametry respirace izolovaných mitochondrií hnědé tukové tkáně kontrolních potkanů chovaných ve 24 ± 1 °C a srovnat je s potkany vystavenými teplotě 8 ± 1 °C po dobu 1 dne, 3 dnů, 10 dnů a 5 týdnů. Výsledky této práce ukázaly, že 1) ke zvýšení respirace dochází již po 1 dni vystavení chladu a 2) nejvyšší respirace v přepočtu na 1 mg mitochondriálního proteinu se zdá být po 10 dnech vystavení chladu.

Klíčová slova: Hnědá tuková tkáň, mitochondrie, respirace, chladová aklimace

Abstract

Historical experiments regarding the influence of low ambient temperatures were often accompanied with the development of detrimental effects. Our laboratory recently published a protocol of mild cold acclimation (5 weeks in 8 ± 1 °C) which induces cardioprotective phenotype in rats (*Rattus norvegicus*). An important mechanism of cold acclimation is the activation and increase of brown adipose tissue. Besides the nonshivering thermogenesis brown adipose tissue can produce a multitude of autocrine, paracrine, and endocrine factors which might positively influence whole-body metabolism and function of other important organs. The effect of cold acclimation on brown adipose tissue is not however explored very well. The aim of this work was to assess selected parameters of respiration of isolated brown adipose tissue mitochondria of control rats living in 24 ± 1 °C and compare it with that of rats exposed to 8 ± 1 °C for 1 day, 3 days, 10 days, and 5 weeks. Results of this work were 1) the increase in respiration occurs after the 1-day cold exposure and 2) the highest respiration per 1 mg of mitochondrial protein appears to be after the 10 days of cold exposure.

Key-words: Brown adipose tissue, mitochondria, respiration, cold acclimation

Obsah

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Seznam zkratek | 8 |
| 2 | Úvod | 11 |
| 3 | Homoiotermové a chlad | 12 |
| 4 | Termogenní tuková tkáň..... | 13 |
| 4.1 | Hnědá tuková tkáň | 13 |
| 4.1.1 | Morfologie..... | 13 |
| 5.1.1 | Metabolismus BAT | 14 |
| 5.1.2 | Vývojový původ BAT | 16 |
| 6.1 | Běžová tuková tkáň | 17 |
| 6.1.1 | Vývojový původ BeAT | 17 |
| 7 | UCP1-nezávislá termogeneze v tuku | 19 |
| 8 | Sekreční vlastnosti termogenní tukové tkáně..... | 20 |
| 8.1 | Autokrinní a parakrinní faktory | 20 |
| 8.2 | Endokrinní faktory..... | 21 |
| 8.2.1 | FGF21..... | 22 |
| 8.2.2 | IL6 | 22 |
| 9 | Funkční analýza izolovaných mitochondrií | 23 |
| 10 | Respirometrie | 25 |
| 10.1 | Respirometrie s vysokým rozlišením..... | 25 |
| 10.2 | Respirometr O2k..... | 26 |
| 11 | Materiál a metody..... | 27 |
| 11.1 | Laboratorní zvířata | 27 |
| 11.2 | Odběr tkání..... | 27 |
| 11.2.1 | Izolace mitochondrií..... | 27 |
| 11.3 | Respirometrie | 28 |
| I. | Protokol – Respirace závislá na UCP1 | 28 |

| | | |
|------|--|----|
| II. | Protokol – Substrate Uncoupler Inhibitor Titration | 29 |
| 11.4 | Měření proteinů podle Bradfordové..... | 29 |
| 11.5 | Statistické vyhodnocení dat | 29 |
| 12 | Cíle | 30 |
| 14 | Výsledky..... | 31 |
| 14.1 | Tělesná hmotnost zvířat | 31 |
| 14.2 | Hmotnost hnědé tukové tkáně..... | 32 |
| 14.3 | Maximální nespřažená respirace (Protokol I) | 33 |
| 14.4 | UCP1-závislá respirace (Protokol I) | 34 |
| 14.5 | UCP1-nezávislá rozpřažená respirace (Protokol I)..... | 35 |
| 14.6 | Coupling control ratio pro oligomycin (Protokol I)..... | 36 |
| 14.7 | Respirace komplexů I+II (Protokol II) | 37 |
| 15 | Diskuze..... | 38 |
| 16 | Závěr..... | 42 |
| 17 | Seznam literatury..... | 43 |
| 18 | Přílohy | 58 |

1 Seznam zkratek

| | |
|---------------|---|
| ADP | adenosindifosfát |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BAT | hnědá tuková tkáň, z ang. brown adipose tissue |
| BeAT | běžová tuková tkáň, z ang. beige adipose tissue |
| BSA | hovězí sérový albumin, z ang. bovine serum albumine |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát |
| CD137 | receptor-9 ze superrodiny receptorů pro faktor nádorové nekrózy, z ang. tumor necrosis factor receptor superfamily member-9 |
| CI-CIV | komplexy I-IV elektrontransportního řetězce |
| CoQ | koenzym Q, ubichinon |
| COX2 | cyklooxygenáza-2 |
| CR1 | kanabinoidní receptor-1 |
| DMH | dorsomediální hypotalamus |
| EN1 | engrailed-1 |
| ETC | elektron transportní řetězec |
| FGF2 | fibroblastový růstový faktor-2 |
| FGF21 | fibroblastový růstový faktor-21 |
| GDP | guanosindifosfát |
| HRR | respirometrie s vysokým rozlišením, z ang. high resolution respirometry |
| IGF1 | inzulinu podobný růstový faktor-1 |
| IL6 | interleukin-6 |
| LacZ | β -galaktosidáza |
| L-PGDS | lipokalinová prostaglandin-D-syntáza |

| | |
|---------------------------------|--|
| MnPO | mediální preoptické jádro hypotalamu |
| MYF5 | myogenní faktor-5 |
| NGF | nervový růstový faktor |
| NO | oxid dusnatý |
| NOS | syntáza oxidu dusnatého |
| Omy | oligomycin |
| PCOS | syndrom polycystických vaječníků, z ang. polycystic ovary syndrome |
| PDGFRα | receptor- α z destiček odvozeného růstového faktoru, z ang. platelet derived growth factor receptor |
| PGC1α | 1 α koaktivátor gamma receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů, z ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α |
| PPARγ | receptor- γ aktivovan peroxisomovými aktivátory, z ang. peroxisome proliferator-activated receptor- γ |
| PRDM16 | protein 16 obsahující PR doménu, z ang. PR domain containing 16 |
| <i>Ptgs2</i> | gen prostaglandin-endoperoxidsyntázy 2 |
| QH2 | redukovaný koenzym Q |
| RK | respirační kvocient |
| ROS | reaktivní formy kyslíku, z ang. reactive oxygen species |
| RyR2 | ryanodinový receptor-2 |
| SERCA2b | Ca ²⁺ ATPáza sarkoplazmatického/endoplazmatického retikula 2 b |
| sLR11 | receptor-11 pro rozpustný lipoprotein s nízkou hustotou |
| SUIT | z ang. substrate uncoupler inhibitor titration |
| T3 | trijódtyronin |
| T4 | tyroxin |
| TMEM26 | transmembránový protein-26 |

| | |
|--------------|--|
| TZD | thiazolidindiony |
| UCP1 | rozpřahující protein-1, z ang. uncoupling protein-1 |
| VEGFA | cévní endoteliální růstový faktor-A, z ang. vascular endothelial growth factor A |
| WAT | bílá tuková tkáň, z ang. white adipose tissue |

2 Úvod

Ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda vedou dlouhodobě v žebříčku nejčastějších příčin úmrtí na světě, společně jsou odpovědné za asi 27 % všech úmrtí na světě od roku 2000. V posledních 20 letech se do první desítky dostal i diabetes mellitus 2. typu, který od roku 2000 zaznamenal 70% nárůst v počtu úmrtí (Kochar, 2020). Proto je investováno stále více prostředků do výzkumu relevantních preventivních a terapeutických přístupů pro zmírnění dopadů těchto civilizačních onemocnění. Jedním z potenciálních kandidátů je chladová aklimace neboli otužování.

Historické práce zabývající se chladovou aklimací zpravidla používaly protokoly vystavující organismus příliš intenzivnímu chladu. Výsledný stres pak způsoboval nežádoucí účinky jako hypertrofii myokardu a hypertenzi. Vystavení chladu bylo tedy dlouho považováno za rizikový faktor pro kardiovaskulární zdraví.

Dnes již víme, že pravidelné otužování za přiměřených podmínek stimuluje hormonální dráhy, imunitní systém a metabolismus (Chondronikola *et al.*, 2014; Lubkowska *et al.*, 2013). Co se kardiovaskulárního systému týče, na našem pracovišti byl nedávno objeven model mírné chladové aklimace, který působí kardioprotektivně – signifikantně zmenšuje velikost infarktu myokardu po ischemicko-reperfúzním poškození a to bez prokazatelných nežádoucích účinků (Tibenska *et al.*, 2020).

Předpokládá se, že důležitou součástí podílející se na vzniku těchto pozitivních fyziologických změn je hnědá tuková tkáň (BAT). Kromě funkce metabolické má totiž BAT nezanedbatelnou sekreční funkci. BAT je navíc schopen v průběhu chladové aklimace růst a zkvalitňovat (Blondin *et al.*, 2014). Přesto víme jen málo o tom, jakým způsobem reaguje BAT na různě dlouhé expozice chladu a dochází-li v určité chvíli k rozvoji nežádoucích účinků.

Nejdůležitějšími organelami, které poskytují BAT jeho jedinečné vlastnosti jsou jednoznačně mitochondrie, a proto jsme zvolili metodu respirometrie s vysokým rozlišením (HRR) umožňující přesné měření na úrovni samotných mitochondrií. Mým cílem bylo změřit kapacitu mitochondriální respirace z izolovaných mitochondrií BAT v průběhu našeho protokolu mírné chladové aklimace a dodat tak další dílčí informace pro pochopení jejího mechanismu a vývoje a potenciálně odhalit vznikající mitochondriální disfunkce.

3 Homoiotermové a chlad

Lidé jsou, stejně tak jako ostatní savci, homoiotermové. Jsou tedy schopni udržet stálou tělesnou teplotu v relativně širokém rozmezí teplot prostředí. Teploty prostředí pod termoneutrální zónou organismu aktivují nejprve periferní termoreceptory lokalizované v kůži a následně mohou aktivovat i termoreceptory centrální. Aferentní signály z těchto receptorů směřují do preoptické oblasti hypotalamu, kde dochází k jejich vyhodnocení a následné aktivaci eferentních drah působících na efektorové orgány odpovědné za termogenezi. Termogenezi klasicky rozdělujeme na třesovou, vycházející ze svalové aktivity a netřesovou, vycházející z hnědé tukové tkáně (BAT) a biochemických reakcí (pro přehled Hammel, 1968).

Chladem vyvolaný nárůst metabolické aktivity nezávislý na aktivitě svalů byl poprvé popsán u chladově aklimovaných potkanů (Cottle & Carlson, 1956). Brzy potom byl sympatikus identifikován jako mediátor této netřesové termogeneze (Hsieh *et al.*, 1957). Za hlavního producenta netřesové termogeneze je považován BAT.

Je-li netřesová termogeneze nebo ostatní mechanismy jako behaviorální odpověď, nebo vazokonstrikce neefektivní v udržení tělesné teploty, dochází k aktivaci třesové termogeneze. Proto je začátek třesu používán jako ukazatel dosažení maximální vazokonstrikce (DeGroot & Kenney, 2007). Třes byl definován jako mimovolní oscilující kontrakce kosterních svalů, při kterých dochází k hydrolýze adenosintrifosfátu (ATP), ale není vykonávána svalová práce a energie je uvolňována převážně ve formě tepla. U dospělého člověka může docházet k produkci tepla odpovídající asi pětinašobku bazálního metabolického obratu (Eyolfson *et al.*, 2001). Třesová termogeneze je aktivována eferentní dráhou vycházející z mediálního preoptického jádra (MnPO) hypotalamu, inhibující projekce do dorsomediálního hypotalamu (DMH), nakonec vedoucí k aktivaci somatosenzorických výstupů z míchy přímo k efektorovým svalům (Nakamura & Morrison, 2011).

4 Termogenní tuková tkáň

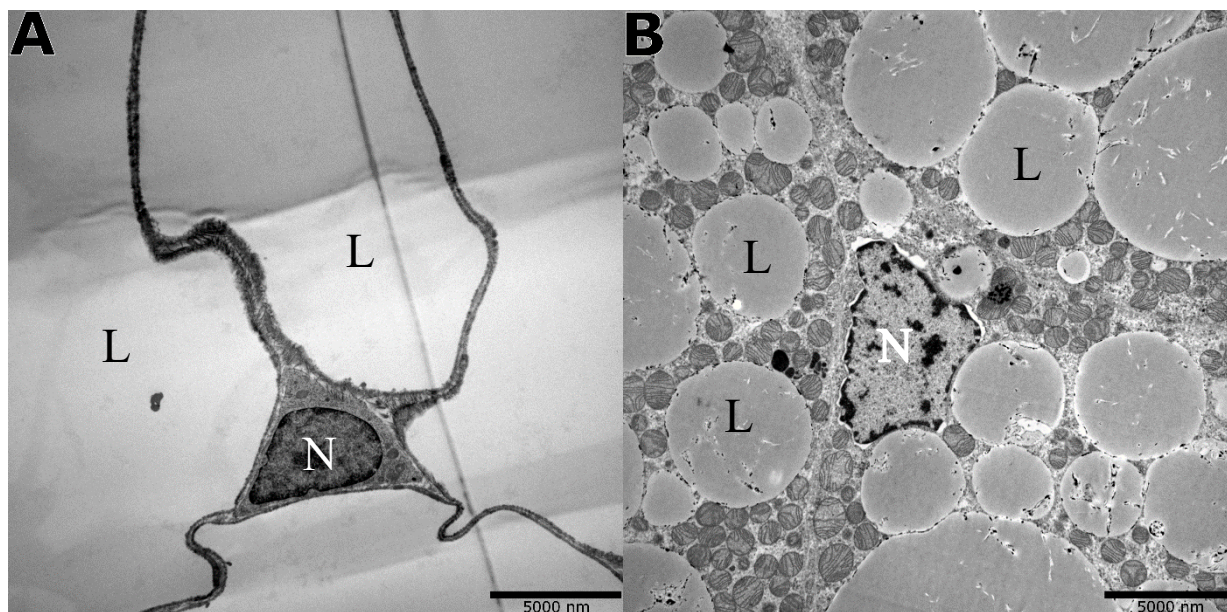
V současnosti jsou nám známy minimálně dva druhy termogenní tukové tkáně, které byly nalezeny u hlodavců i člověka, a to hnědá tuková tkáň (BAT) a běžová tuková tkáň (BeAT). Liší se zejména svým původem, regulací diferenciace, lokalizací v organismu a potenciálně i mechanismem termogeneze. Zvýšená aktivita je u myšího modelu spojována s rezistencí vůči obezitě (pro přehled Ikeda *et al.*, 2018).

4.1 Hnědá tuková tkáň

Na rozdíl od ostatních savčích orgánů má vědecký výzkum BAT relativně krátké trvání. Termogenní schopnost BAT byla objevena teprve v 60. letech minulého století (Smith, 1961). Od té doby je BAT relativně populárním tématem zejména v oblasti energetické bilance organismu v kontextu civilizačních onemocnění jako je obezita a diabetes mellitus.

4.1.1 Morfologie

Buňky BAT jsou typicky multilokulární (obsahující množství malých kapének triacylglycerolů) a mají charakteristické hnědé zbarvení kvůli velkému množství mitochondrií (Obr. 1 b). Pokud jsou buňky termogenně neaktivní jsou zaplněny lipidy a mohou tak na venek připomínat buňky bílého tuku (WAT, Obr. 1 a) (pro přehled Nedergaard & Lindberg, 1982). Buňky BAT jsou propojeny pomocí mezerových spojů a přímo inervovány sympatickými nervy (Ricquier *et al.*, 1985; Schneider-Picard *et al.*, 1984). Díky husté vaskularizaci jsou schopné při stimulaci vysoce zvýšit zásobení krví (Hirata, 1982). BAT se v organismu nevyskytuje náhodně. Nacházíme ho zejména u mláďat a dětí kde zastupuje třesovou termogenezi jako kompaktní tkáň v interskapulární, perirenální, axilární a perikostální oblasti. Nicméně funkční BAT zůstává zachovaný i u dospělých (van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009).

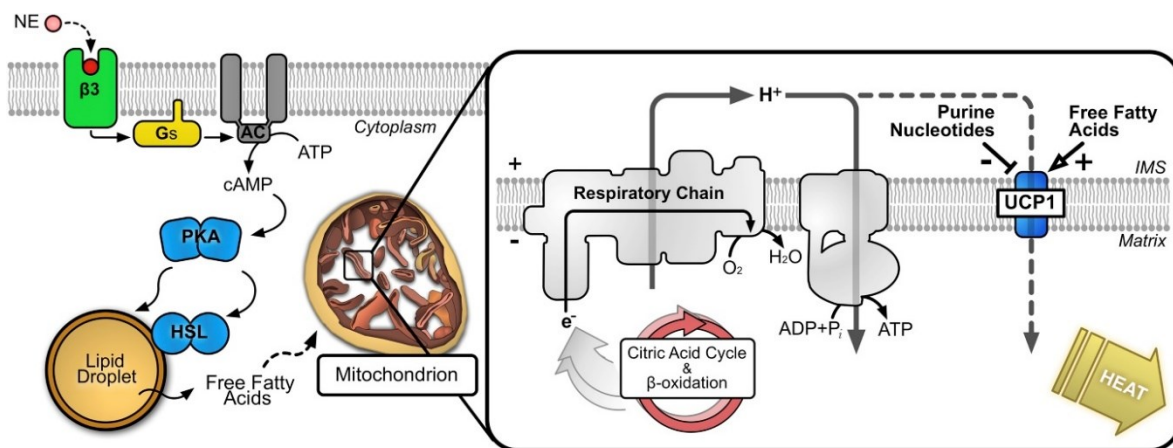


Obrázek 1: Srovnání buněčné morfologie bílého tuku (A) a BAT (B) potkana. L, lipidová kapénka; N, jádro. Elektronová mikrofotografie pořízena pomocí Transmisního Elektronového Mikroskopu JEOL JEM-1011. Se svolením autorky RNDr. Barbary Elsnicové Ph.D.

5.1.1 Metabolismus BAT

BAT je tkáň s vysokou oxidativní kapacitou. Aktivovaný BAT získává energii primárně z mastných kyselin katabolizovaných mitochondriální β -oxidací (Labbé *et al.*, 2015). Lipolýza, stejně tak jako termogeneze je aktivována noradrenalinem skrze β 3-adrenergní receptory (Obr. 2 levá část) (Arch *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 1994). Oba procesy jsou podřízeny tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), lze je totiž indukovat aktivátorem adenylátcyklázy forskolinem nebo analogy cAMP (Connolly *et al.*, 1986; Fain *et al.*, 1984; Reed & Fain, 1968). Závislost termogeneze na mastných kyselinách vychází z jejich aktivace rozpráhuujícího proteinu-1 (UCP1) (Matthias *et al.*, 2000). Nejprve jsou vyčerpány intracelulární zásoby triglyceridů, které následně nahrazují substráty z krve (Chondronikola *et al.*, 2014). Naproti tomu glukóza zásobuje při maximální stimulaci jen asi 2 % termogeneze (Ma & Foster, 1986). Nicméně existují práce ukazující schopnost chladem aktivovaného BAT zvyšovat systémové využití glukózy a citlivost na inzulín (Blondin *et al.*, 2014; Chondronikola *et al.*, 2014). Aktivace termogeneze kromě metabolismu výrazně zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které ovšem podporují *in vivo* termogenezi senzibilací UCP1 k aktivaci (Chouchani *et al.*, 2016).

UCP1 neboli thermogenin je protein typický pro BAT odpovědný za termogenezi (Heaton *et al.*, 1978). Funguje jako transmembránový přenašeč lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně, který po své aktivaci mastnými kyselinami facilituje influx H^+ do matrix, tím rozpřahuje ATP-syntázu od elektron-transportního řetězce (ETC) a protonmotivní sílu disipuje ve formě tepla (Fedorenko *et al.*, 2012). UCP1 může být inhibován fyziologickými koncentracemi purinových nukleotidů s největší afinitou pro guanosindifosfát (GDP) (Obr. 2 pravá část) (Nicholls, 1974). Během chladové aklimace dochází nejen k nárůstu celkové hmoty BAT, ale i množství UCP1 (Blondin *et al.*, 2014; Desautels *et al.*, 1978).



Obrázek 2: Mechanismus transdukce signálu vedoucího k aktivaci termogeneze pomocí UCP1. NE, norepinefrin; β_3 , β_3 -adrenergní receptor; Gs, G-protein s Gs a podjednotkou; AC, adenylylacykláza; ATP, adenosintrifosfát; ADP, adenosindifosfát; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; PKA, proteinkináza A; HSL, hormon-senzibilní lipáza; UCP1, rozpřahující protein-1; IMS, mezimembránový prostor. Převzato z Crichton *et al.* (2017).

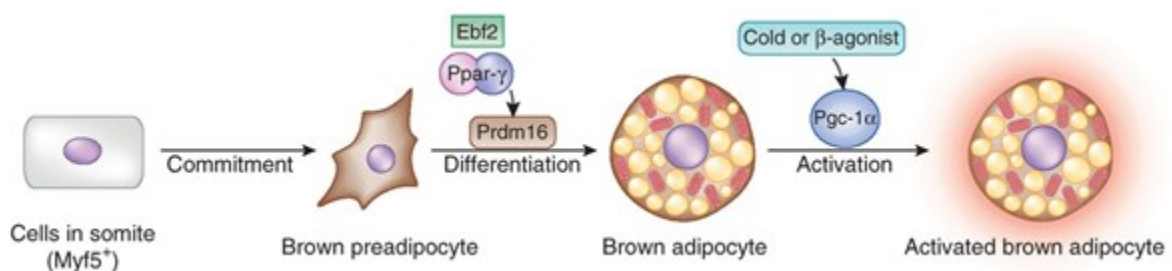
1 α koaktivátor gamma receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů (PGC1 α) byl původně identifikován v BAT jako chladem indukovatelný koaktivátor receptorů- γ aktivovaných peroxisomovými aktivátory (PPAR γ). Je považován za řídicí regulátor mitochondriální biogeneze a oxidativního metabolismu ve většině buněčných typů, nevyjímaje BAT a kosterní svalstvo. Výsledkem genetické ablace PGC1 α u myši byla snížená kapacita chladové termogeneze *in vivo* a utlumená odpověď na cAMP signalizaci *in vitro* v kultuře BAT. Na druhou stranu ektopická exprese PGC1 α v buňkách WAT indukovala řadu mitochondriálních genů jako *Ucp1* (Puigserver *et al.*, 1998).

5.1.2 Vývojový původ BAT

Obecně všechny buňky tuku, bez ohledu na jejich typ vznikají během embryonálního vývoje z kmenových buněk mezodermy, s výjimkou malých tukových ložisek lebky vznikajících z kmenových buněk neurální lišty. Velká většina tukové tkáně má tedy podobný původ jako ostatní mezodermální tkáně (kosterní svalstvo, kosti a jiné pojivové tkáně) (pro přehled Billon *et al.*, 2008). BAT je nicméně z hlediska dalšího vývoje mnohem podobnější kosternímu svalstvu než WAT. Prekurzory izolované z BAT totiž vykazovaly, na rozdíl od WAT, expresi genů řídících myogenní vývojovou dráhu (Timmons *et al.*, 2007). Konkrétně byla zaznamenána exprese genu pro transkripční faktor myogenní faktor-5 (MYF5), jehož exprese se dříve předpokládala pouze v myoblastech, a gen pro transkripční faktor engrailed-1 (EN1) běžně exprimovaný v buňkách centrálního dermomyotomu (Obr. 3) (Atit *et al.*, 2006; Seale *et al.*, 2008). Studie mitochondriálního proteomu BAT navíc ukázaly jeho vysokou podobnost s kosterním svalem, ale ne s WAT (Forner *et al.*, 2009).

5.1.2.1 PRDM16

Protein 16 obsahující PR doménu (PRDM16) je 140 kDa velký protein se strukturními motivy zinkového prstu, který byl poprvé nalezen u lidských buněk akutní myeloidní leukemie (Mochizuki *et al.*, 2000). PRDM16 je ovšem také vysoce exprimován v BAT. Významné je, že pokud byl PRDM16 ektopicky exprimován v preadipocytech bílého tuku nebo myoblastech indukoval u nich téměř kompletní genetický program BAT. To zahrnuje biogenezi mitochondrií, zvýšení buněčné respirace a expresi BAT specifických genů (*Ucp1*, *Pgc1a* a *deiodáza-d2*). Tyto výsledky implikují PRDM16 jako kritický pro vznik linie BAT z myoblastových progenitorů během embryonálního vývoje (Seale *et al.*, 2007).



Obrázek 3: Vývojová linie adipocytů BAT a jejich aktivace. BAT pochází z populace *Myf5*-exprimujících prekurzorů. Raný faktor B-buněk 2 (*Ebf2*) kooperuje s *PPARγ* na aktivaci exprese *PRDM16*, který následně řídí změnu na hnědý adipocyt. Termogeneze v maturovaných hnědých adipocytech je aktivována β -agonisty, která spouští signální kaskádu zvyšující aktivitu a expresi transkripčního koaktivátoru *PGC1α*, který koordinuje termogenní genový program. Převzato z Harms & Seale (2013)

6.1 Běžová tuková tkáň

Zatímco BAT tvoří samostatná a relativně homogenní ložiska, BeAT se vyvíjí v rámci bílé tukové tkáně jako odpověď na určité stimuly, zejména chlad. Podobně jako adipocyty BAT mají buňky BeAT multilokulární lipidové kapénky, velké množství mitochondrií a exprimují klíčové geny jako *Ucp1* a *Pgcl α* . I přes tyto podobnosti mají BAT a BeAT mnoho rozdílů, kvůli kterým by měly být považovány za odlišné buněčné typy (Vitali *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Na rozdíl od BAT, který vykazuje vysokou expresi UCP1 i bez stimulace, BeAT respektive jejich prekurzory v kultuře nespouští termogenní program dokud nejsou ošetřeny látkami jako thiazolidindiony (TZD) aktivující PPARs nebo β -adrenergními agonisty (Ohno *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Přesto Wu *et al.* (2012) ukázali, že stimulovaný BAT a BeAT mají srovnatelná množství UCP1 a potenciálně i podobnou termogenní kapacitu. Další související vlastností je vratnost termogenního programu. Buňky BeAT získané během vystavení chladu ztrácí po návratu myši do tepla expresi UCP1, ale buňky samotné zůstávají. Po znovu vystavení chladu stejné buňky znovu aktivují expresi UCP1. Je tedy možné, že BeAT zvířat dříve vystavených chladu může v teple po určitou dobu plnit funkci podobnou WAT. Takové buňky jsou pravděpodobně po čase odstraněny mechanismy řídicími normální obnovu tkání (Rosenwald *et al.*, 2013).

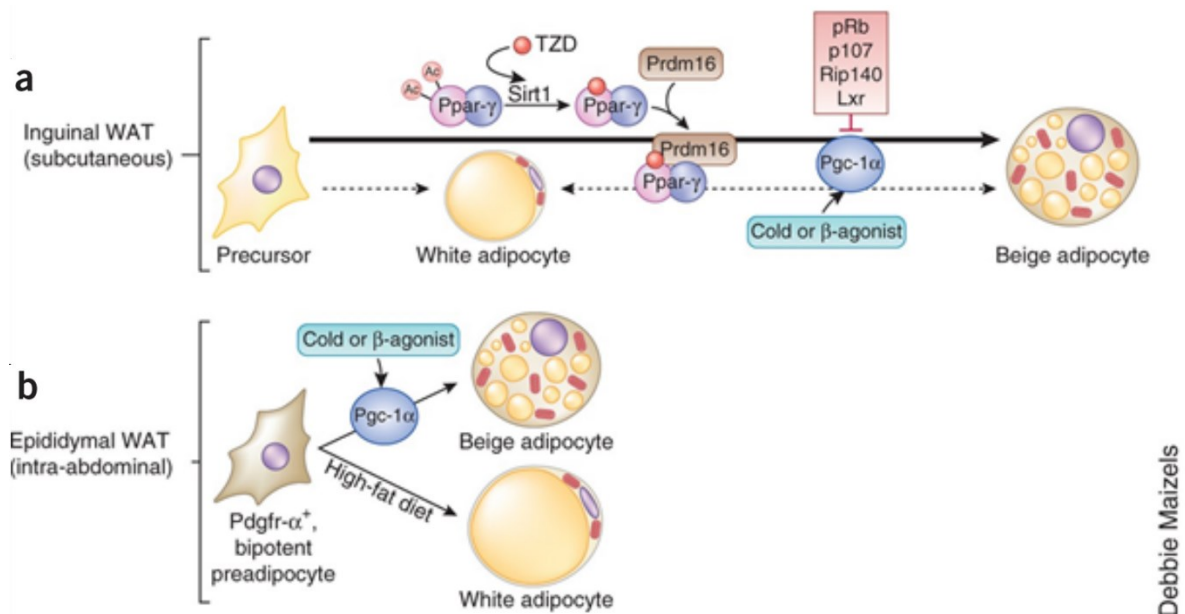
6.1.1 Vývojový původ BeAT

Vývojový původ BeAT zůstává nejasný. Můžeme však s relativní jistotou říct, že buňky BeAT nejsou diferencované ze stejné *Myf5* exprimující buněčné linie jako BAT (Seale *et al.*, 2008). Důležitá otázkou je, zdali BeAT vzniká metaplázií z adipocytů WAT, nebo *de novo* diferenciací a maturací prekurzorových buněk. Himms-Hagen *et al.* (2000) jako jedni z prvních podpořili teorii metaplázie, když ukázali na potkaním modelu, že většina buněk BeAT indukovaných v retroperitoneálním (viscerálním) WAT chronickou infuzí β 3-adrenergního agonisty CL-316243 vznikla z již existujících nedělících se adipocytů. Novější práce však podporují spíše teorii *de novo* diferenciaci. Wang *et al.* (2013) vyšlechtili nový model transgenních myši, který jim dovoluje označit adipocyty pomocí β -galaktosidázy (LacZ) tak, že LacZ je konstitutivně exprimována jak v označených adipocytech, tak i v jejich dceřiných buňkách (Soriano, 1999). Takto označené myši byly následně stimulovány chladem, nebo β 3-adrenergními agonisty za účelem indukce BeAT. Následná analýza inguinálního (subkutánního) WAT ukázala, že většina nově získaných UCP1 exprimujících adipocytů nebyla označena pomocí LacZ. To indikuje, že většina, pokud ne všechny adipocyty BeAT (alespoň v inguinálním ložisku)

vznikají z populace prekurzorů, nikoliv z již existujících adipocytů. Pokud tedy přepokládáme, že BeAT vzniká diferenciací z prekurzorových buněk v rámci WAT, zůstává otázka, zdali existuje jeden prekurzor pro WAT i BeAT jehož osud je řízen externími stimuly, nebo dva různé prekurzory s předem determinovaným vývojem.

V případě subkutánního tuku mluví výsledky ve prospěch existence dvou prekurzorů. Wu *et al.* (2012) identifikovali v kultuře preadipocytů z inguinálního WAT dva typy prekurzorů – bílý a béžový. Oba typy postrádaly za normálních podmínek termogenní vlastnosti. Nicméně pouze béžový typ byl schopen po stimulaci nastartovat termogenní program. Současně objevili povrchové markery, receptor ze superrodiny receptorů pro faktor nádorové nekrózy 9 (CD137) a transmembránový protein-26 (TMEM26), typické pro béžové prekurzory, což umožňuje jejich přímou identifikaci v tukových tkáních.

Naproti tomu v epididymálním (viscerálním) tuku myších samců se BeAT vyvíjí ze stejného prekurzoru jako WAT. Tyto bipotentní prekurzory exprimují receptor- α z destiček odvozeného růstového faktoru (PDGFR α) a jsou úzce asociované s cévami. Po stimulaci β -adrenergními agonisty proliferují, ztrácí expresi PDGFR α a diferencují v UCP1⁺ adipocyty. Proti tomu tučná strava stimuluje diferenciaci PDGFR α ⁺ prekurzorů v buňky WAT (Lee *et al.* 2012).



Debbie Maizels

Obrázek 4: a) V inguinálním (subkutánním) tuku aktivuje β -adrenergní stimulace především *de novo* diferenciaci z příslušných prekurzorových buněk (tučná šipka). Zůstává ovšem možnost, že za určitých okolností jsou maturované bílé adipocyty schopné metaplázie (šrafovaná šipka). TZD agonisté PPAR γ podporují hnědnutí zvýšením stability PRDM16 a skrze deacetylaci PPAR γ pomocí Sirtuinu1 (Sirt1), což vede k navázání PRDM16 na PPAR γ . β -adrenergní signalizace řídí expresi a aktivaci PGC1 α v BeAT, za normálních podmínek je Pgc1 α cílem mnoha represorů: pRb, retinoblastomový protein; p107, retinoblastomu podobný protein 1; RIP140, s receptory interagující protein 140; LXR, jaterní x receptor. b) V epididymálním (viscerálním) WAT stimuluje nadbytek kalorií diferenciaci bipotentních prekurzorů ve WAT, kdežto β -adrenergní stimulace stimuluje vývoj BeAT. Převzato z Harms & Seale (2013).

7 UCP1-nezávislá termogeneze v tuku

Pokud jsou *Ucp1*^{-/-} myši vystaveny chladu (5 °C) do 10 hod u nich nastane hypotermie (Enerbäck et al., 1997). Pokud ovšem budeme stejné *Ucp1*^{-/-} myši postupně aklimovat k chladu snižováním okolní teploty o 2 °C/den, takové myši jsou pak schopné udržet v chladu stálou teplotu jádra a přežít (Ukropec et al., 2006). Přestože svalová netřesová termogeneze může přispívat k udržení stálé tělesné teploty, nedávná studie ukázala pomocí měření tkáňové teploty, že subkutánní BeAT hraje významnou roli v termoregulaci při absenci UCP1 (Bal et al., 2012). Tato studie využila transgenní myši model *Ucp1*^{-/-}, u kterého je biogeneze BeAT aktivována geneticky selektivní expresí PRDM16 v tuku. Překvapivě zjistili, že tyto myši kompletně chráněny proti hypotermii vyvolané chladem, přestože svalová termogeneze příliš nepřispívá k tomuto fenotypu. Místo toho je příčinou buněčná termogenní aktivita BeAT, to bylo ověřeno *in vitro*, kde tyto buňky vykazovali robustní termogenní aktivitu po stimulaci noradrenalinem. Navíc nárůst BeAT ochránil transgenní myši před obezitou a působil pozitivně na homeostázu glukózy i přes absenci UCP1, což jsou vlastnosti často připisované právě UCP1⁺ buňkám (Ikeda et al., 2017).

Za mechanismus UCP1-nezávislé termogeneze v BeAT je odpovědná alespoň částečně Ca²⁺ ATPáza sarkoplazmatického/endoplazmatického retikula 2 b (SERCA2b) a ryanodinový receptor 2 (RyR2). Inhibice SERCA2b zhoršuje UCP1- nezávislou termogenezi v BeAT u myši, lidí a prasat, která kompletně postrádají funkční UCP1 (Berg et al. 2006; Ikeda et al., 2017). K termogenezi SERCA2b dochází, když je její hydrolýza ATP rozprážená od přenosu Ca²⁺ dovnitř endoplazmatického retikula a získaná energie je tak disipována ve formě tepla, to znamená, že se jedná o ATP-závislou termogenezi (Sahoo et al., 2013). Molekuly rozpráhuující hydrolýzu ATP od přenosu Ca²⁺ skrz SERCA2b jsou zatím neznámé.

Dalším příkladem UCP1-nezávislé termogeneze je prázdný cyklus kreatinu, který je aktivní v mitochondriích BAT a BeAT. Dochází k cyklu fosforylace/defosforylace kreatinu, což vede ke zvýšené aktivitě oxidativní fosforylace a celkovému nárůstu mitochondriálního metabolismu (Kazak et al., 2015).

Tyto mechanismy termogeneze jsou mnohem důležitější v BeAT. Příčinou je pravděpodobně nižší kapacita BAT pro syntézu ATP což znemožňuje dlouhodobé udržení ATP-závislé termogeneze. Naproti tomu BeAT schopný dostatečně tvořit ATP, může těmito mechanismy kompenzovat nedostatek, nebo zcela chybějící UCP1.

8 Sekreční vlastnosti termogenní tukové tkáně

Kromě termogeneze mají BAT a BeAT nezanedbatelnou sekreční funkci. Látky produkované těmito tkáněmi jsou obecně nazývány batokiny. I přes jejich vývojové rozdíly je většina batokinů produkována jak BAT, tak i BeAT a dosud nemáme přímé důkazy o rozdílných sekrečních profilech těchto typů tkání (Sharp *et al.*, 2012). Podrobný rozbor látek secernovaných BAT není předmětem této práce, proto byly vybrány jen některé.

8.1 Autokrinní a parakrinní faktory

Bylo indentifikováno mnoho látek produkovaných BAT, které mohou být secernovány během diferenciaci anebo termogenní aktivace. Přestože mnohdy nemáme přímé experimentální důkazy o specifickém působení těchto batokinů, naše obecné znalosti o jejich funkci napovídají, že mohou mít autokrinní a parakrinní funkce. Například nervový růstový faktor (NGF) a fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) pravděpodobně rozvíjí sympatickou inervaci a zvyšují počet preadipocytů v BAT, což je významné pro vývoj a termogenní nárůst BAT během chladové expozice (Néhad *et al.*, 1994; Nisoli *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 1994). Dalším významným faktorem je cévní endoteliální růstový faktor-A (VEGFA), který může podporovat vaskularizaci v rámci BAT v chladu nezávisle na hypoxii, která typicky stimuluje VEGFA (Asano *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2009). Zvýšená perfúze je asociována s chladovou aktivací BAT u hlodavců i u lidí (Foster & Frydman, 1979; Orava *et al.*, 2011). Zvýšená exprese VEGFA specifická pro BAT dokáže u myši za podmínek chronické expozice chladu zvyšovat vaskularizaci a aktivitu UCP1, což vede ke zvýšené termogenní kapacitě (Sun *et al.*, 2014). Přímé autokrinní působení VEGFA dále podporuje skutečnost, že knockout genu *Vegfa* v tuku myši narušil termogenní funkci BAT snížením mitochondriální respirace (Mahdavian *et al.*, 2016).

BAT secernuje také nepeptidické signální molekuly. Existují práce popisující účast prostaglandinů na aktivitě BAT a hnědnutí WAT. U myši s poruchou genu prostaglandin-endoperoxidsyntázy-2 (*Ptgs2*), který kóduje cyklooxygenázu-2 (COX2) nezbytnou pro tvorbu prostaglandinů, dochází narušení hnědnutí WAT (Vegiopoulos *et al.*, 2010). Později bylo zjištěno, že prostaglandin E2 přímo indukuje hnědnutí WAT. Specificky farmakologická inhibice biogeneze prostaglandinu E2 snížila kapacitu myších preadipocytů diferencovat v BeAT (García-Alonso & Clària, 2014). Naproti tomu knockout lipokalinové prostaglandin-D-syntázy (L-PGDS) narušil aktivaci BAT (Virtue *et al.*, 2012). BAT secernuje L-PGDS, která

má další funkce jako transport tyroidních hormonů a derivátů vitamínu A krví (Tanaka *et al.*, 1997).

Dále indukuje chladová aktivace BAT produkci syntázy oxidu dusnatého (NOS) v této tkáni, což může společně s VEGF přispívat k zlepšení toku krve, který je nezbytný k trofickým změnám BAT (Nisoli *et al.*, 1997). Mimo to může oxid dusnatý (NO) přispívat k hnědnutí WAT. Podávání anorganických dusičnanů potkanům u nich stimulovalo hnědnutí WAT a ošetření kultury myších preadipocytů stejnými dusičnany vedlo ke tvorbě fenotypu BeAT. Je navrhováno, že tyto efekty jsou řízeny NO, který vzniká postupnou redukcí dusičnanů na dusitany a konečně na NO (Roberts *et al.*, 2015).

Přestože se z těchto informací zdá, že všechny autokrinní a parakrinní faktory produkované BAT mají pozitivní efekt na jeho vývoj a funkce, opak je pravdou. Receptor pro lipoprotein s nízkou hustotou (sLR11) potlačuje termogenezi v BAT, přestože ho v chladem aktivovaném BAT přibývá. Tato funkce je možná založena na homeostatickém mechanismu, který omezuje přílišné plýtvání energií, ke kterému dochází při akutní aktivaci termogeneze BAT (Whittle *et al.*, 2015). K analogickému efektu dochází v případě endokannabinoidů. Periferní antagonisté kanabinoidního receptoru-1 (CR1) aktivují termogenezi v BAT (Boon *et al.*, 2014). Zvýšení tonu endokannabinoidního systému, ke kterému při aktivaci BAT dochází se považuje být součástí autokrinní negativní zpětné vazby, která kontroluje β 3-adrenergní aktivaci BAT a hnědnutí WAT (Krott *et al.*, 2016). Nakonec endotelin-1, který je produkován BAT může také tlumit termogenní aktivitu BAT i BeAT (Klepac *et al.*, 2016).

8.2 Endokrinní faktory

Na konci 80. let minulého století byl trijódtyronin (T3) prvním rozeznávaným hormonem produkovaným BAT (Silva & Larsen, 1985). K tomu dochází díky aktivitě 5'-tyroxindejodázy typu-2, která přeměňuje tyroxin (T4) na T3 (Silva & Larsen, 1983). T3 v BAT indukuje expresi UCP1 a ostatních složek termogeneze a během chladové aktivace přispívá BAT k systémové produkci T3 (Bianco & Silva, 1987; Fernandez *et al.*, 1987). To, že by BAT mohl být zdrojem endokrinně působících molekul získalo novou pozornost během experimentů s transplantacemi BAT. Transplantace embryonálního BAT dospělým diabetickým myším může významně zlepšit glykémii, zánětlivost WAT a systémové hladiny adipokinů. Za mediátor tohoto antidiabetického efektu transplantovaného BAT byl označen inzulinu podobný růstový faktor-1 (IGF1) (Gunawardana & Piston, 2012). Transplantovaný BAT měl také pozitivní efekt

na model obézních myší, když redukoval tělesnou hmotnost zatímco zvýšil spotřebu energie a hladiny adiponektinu (Liu *et al.*, 2015).

Jelikož po transplantaci BAT typicky ztrácí svoji vnitřní schopnost vysoké metabolické a termogenní aktivity, jsou pozitivní efekty navozené jeho transplantací vysvětlovány právě produkcí regulačních faktorů (Liu *et al.*, 2013b). Některé práce popsaly, že transplantace BAT dokáže u myši podpořit aktivitu sympatického nervového systému a zvýšit sympatický tonus srdce, jater, kosterních svalů a viscerálního WAT, což naznačuje, že některé domnělé batokiny mohou působit na centrální nervový systém (CNS) (Zhu *et al.*, 2014).

Zajímavým efektem transplantace BAT je schopnost zvrátit anovulaci, hyperandrogenismus a zlepšit plodnost u potkaního modelu syndromu polycystických vaječníků (PCOS). To naznačuje existenci dosud nepopsaných batokinů účastnících se kontroly samičího reprodukčního systému (Yuan *et al.*, 2016).

8.2.1 FGF21

Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21) podporuje spotřebu glukózy v tukové tkáni a zlepšuje systémovou glykémii. Za normálních podmínek jsou největším producentem FGF21 játra, ale chladem aktivovaný BAT je také schopen tvorby a uvolňování vysokých množství FGF21 (Chartoumpakis *et al.*, 2011; Markan *et al.*, 2014). Exprese FGF21 a jeho uvolnění z BAT je regulováno stejným cAMP-závislým mechanismem jako exprese termogenních genů (viz Obr. 2) (Hondares *et al.*, 2011). FGF21 může mít i autokrinní funkci v BAT, protože je schopen zvyšovat expresi termogenních genů a oxidaci glukózy (Hondares *et al.*, 2010). Dalším důležitým místem účinku FGF21 je srdce (Liu *et al.*, 2013a). Které FGF21 dokáže chránit před oxidativním stresem, hypertrofií, a dokonce tlumí patologickou remodelaci myokardu následkem infarktu (Joki *et al.*, 2015; Planavila *et al.*, 2013; Planavila *et al.*, 2015).

8.2.2 IL6

Zvýšená exprese interleukinu-6 (IL6) je asociována s adrenergně aktivovaným BAT (Burýsek & Houstek, 1997). Na první pohled může být asociace prozánětlivého cytokinu a protizánětlivé aktivity BAT zvláštní. Nicméně dnes již víme, že IL6 je odlišný od klasických prozánětlivých cytokinů. Je známo, že jeho produkce v kosterních svalech v odpovědi na cvičení zvyšuje citlivost na inzulin (Mauer *et al.*, 2014). IL6 je zároveň potřebný k indukci hnědnutí WAT v chladu, jak bylo ukázáno u myší s knockoutem *IL6*, u kterých v chladu došlo ke snížení přírůstku UCP1 v subkutánním WAT.

9 Funkční analýza izolovaných mitochondrií

Je obecně přijímanou teorií, že mitochondrie vznikly v eukaryotických buňkách endosymbiózou asi před dvěma miliardami let (Sagan, 1967). Mitochondrie jsou nezbytné pro normální funkci buněk, zejména svojí rolí v oxidaci substrátů a získávání energie. Mitochondriální syntéza ATP je poháněna protonovým gradientem na vnitřní mitochondriální membráně, který je výsledkem aktivity ETC.

ETC se skládá z transmembránových proteinových komplexů (I-IV) a pohyblivých elektronových transportérů ubichinonu (CoQ) a cytochromu c. Komplex I (CI) neboli NADH-ubichinonoxidoreduktáza je největší součástí ETC. Jeho hlavní rolí je přenos páru elektronů z NADH v matrix na CoQ za vzniku redukované formy CoQ (QH₂). Energie uvolněná z přenosu elektronů je využita na vypumpování 4 protonů z matrix do mezimembránového prostoru (Tan *et al.*, 2015). Komplex II (CII) je kromě ETC součástí citrátového cyklu, funguje tedy jako spojení mezi metabolismem a oxidativní fosforylací (OXPHOS). Jako součást citrátového cyklu katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát. CII je dalším vstupem pro elektrony, které přenáší ze sukcinátu na CoQ za vzniku QH₂. Elektronový přenos CII není spojen s transportem protonů. Komplex III (CIII) neboli CoQ-cytochrom-c-oxidoreduktáza přenáší elektrony z QH₂ na cytochrom c. Přenos elektronů je opět spojen s transportem 4 protonů do mezimembránového prostoru. Komplex IV (CIV) neboli cytochrom-c-oxidáza přenáší elektrony z cytochromu c na konečný akceptor O₂ za tvorby H₂O. Zároveň jsou 2 protony transportovány do mezimembránového prostoru. Výslednou protonmotivní sílu tvořenou koncentračním spádem protonů zpět do matrix využívá ATP-syntáza k tvorbě ATP z adenosindisfosfátu a fosfátu (ADP+P) (pro přehled Zhao *et al.*, 2019).

Mitochondrie kromě tvorby chemické energie ve formě ATP uvolňují energii ve formě tepla, regulují apoptózu a jsou hlavním zdrojem ROS. Přestože určité množství ROS je nezbytné pro buněčnou signalizaci, zvýšený oxidační stres může vést k poškození mitochondriální DNA a eventuálně až k apoptóze (Yakes & Van Houten, 1997). Akumulace oxidačního stresu je proto považována za jeden z mechanismů urychlujících stárnutí (Harman, 1956). Přesné stanovení mitochondriální funkce je nezbytné pro pochopení procesu stárnutí a mechanismů příčiny mnohých onemocnění, ale může být použita i pro charakterizaci vývoje energeticky aktivních tkání, jako je BAT (Hirai *et al.*, 2001; Narendra *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011).

Využíváme různé nástroje s jedinečnými výhodami a nevýhodami, které nám pomáhají zkoumat mitochondriální vlastnosti *in vitro* a *in vivo*. Například magnetická rezonanční spektroskopie umožňuje neinvazivní stanovení svalové oxidativní kapacity, rychlost ATP syntézy při rovnovážném stavu a kinetiku citrátového cyklu (Befroy *et al.*, 2008; Kent-Braun & Ng, 2000; Lebon *et al.*, 2001). Největší výhodou těchto metod je schopnost stanovení mitochondriální funkce za fyziologických podmínek s nepoškozeným oběhovým a regulačním systémem. Naproti tomu *ex vivo* metody přinášejí zjednodušení systému a dovolují tak kontrolovaně studovat konkrétní mechanismy jako signální dráhy a jejich molekuly. Maximální aktivity klíčových mitochondriálních enzymů jsou široce používány jako ukazatele mitochondriální oxidativní kapacity. Citrátsyntáza je běžným markerem mitochondriální matrix, zatímco sukcinátdehydrogenáza a cytochrom-c-oxidáza jsou často měřeny jako reprezentativní enzymy vnitřní mitochondriální membrány (Houmard *et al.*, 1998; Rooyackers *et al.*, 1996). Přestože není nelogické vztahovat maximální aktivity těchto enzymů k mitochondriální oxidativní kapacitě, je nepravděpodobné, že by aktivita jednoho enzymu mohla přesně odrážet funkci tak komplexní organely jako je mitochondrie. To vedlo ke snaze vytvořit novou metodu schopnou přímého stanovení mitochondriální funkce a oxidativní kapacity.

10 Respirometrie

Lavoisier a Laplace (1783) si jako první uvědomili, že respirace je v podstatě spalováním. To se stalo podkladem pro základní myšlenku, využití kalorimetrie pro výzkum zdrojů a dynamických změn tepla, která stála na počátku moderní bioenergetiky (pro přehled Gnaiger, 1983a). Metoda respirometrie využívá nepřímé kalorimetrie k měření metabolických změn tepla, měřením spotřeby O_2 , produkce CO_2 a exkrece N ve formě amoniaku, močoviny nebo kyseliny močové (pro přehled Gnaiger, 1983b). von Liebig (1842) ve své klasické práci ukázal, že substráty pro oxidativní respiraci jsou cukry, tuky a bílkoviny. Poměr mezi množstvím spotřebovaného O_2 a vyprodukovaného CO_2 při spalování těchto substrátů se nazývá respirační kvocient (RK), díky kterému můžeme zaznamenat změny v jejich využívání. Pro cukry je $RK = 1$, pro bílkoviny je $RK = 0,9$ a pro tuky je $RK = 0,7$ (Prentice *et al.*, 2013). Tato metoda je nicméně vhodná pouze k měření systémového metabolismu.

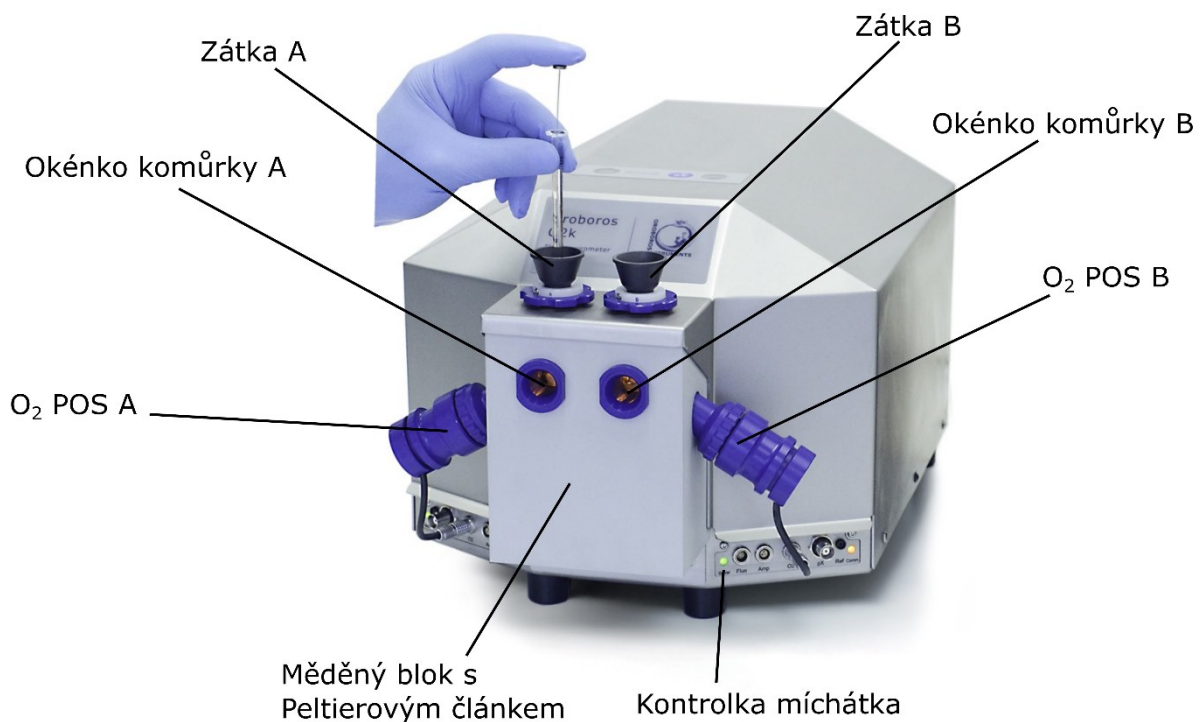
První prototyp přístroje schopného měřit respiraci tkáňových preparátů sestrojili v roce 1902 J. S. Haldane a J. Barcroft, za účelem studia krevních plynů. Změny koncentrace plynů ve skleněných nádobách zaznamenávali jako změny tlaku pomocí připojených manometrů (Barcroft & Haldane, 1902). Přestože nijak výrazně nepřispěl k jeho vývoji, zažilo se pro tento přístroj jméno Warburgův aparát podle německého laureáta Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu z roku 1931 Otto H. Warburga. Warburg totiž při výzkumu metabolismu ukázal ohromnou všestrannost tohoto přístroje a zároveň vyslovil nové principy a vyvinul nové metody jeho použití (pro přehled Oesper, 1964).

10.1 Respirometrie s vysokým rozlišením

Měření buněčné respirace přináší důležité informace o mitochondriální respirační kapacitě, mitochondriální integritě a celkovém energetickém metabolismu (Lanza & Nair, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Respirometrie s vysokým rozlišením (HRR) je moderní metoda umožňující měření spotřeby O_2 v uzavřeném systému s velmi vysokou citlivostí. Používá se k měření respirace malých vzorků tkání, buněk nebo izolovaných mitochondrií. O_2 v roztoku je možné měřit polarograficky pomocí Clarkovy elektrody. Clarkovy elektrody mají zlatou, nebo platinovou katodu a stříbrnou anodu, které jsou spojeny solným mostem a zakryty membránou propustnou pro O_2 . Jak O_2 difunduje přes membránu je redukován stálým napětím mezi elektrodami což generuje proud v závislosti na koncentraci O_2 v roztoku. Kalibrační napětí se známou koncentrací O_2 je možné měřit rychlost spotřeby O_2 v roztoku obsahujícím aktivní mitochondrie atp. (Clark *et al.*, 1953).

10.2 Respirometr O2k

Respirometr O2k vyráběný firmou Oroboros Instruments (Innsbruck, Rakousko) je jedním z komerčně dostupných systémů schopných měření HRR a byl použit k vypracování této práce (Obr. 5). Přístroj disponuje dvěma měřicími komůrkami, každá o objemu 2 ml s velkými katodami o průměru 2 mm, které umožňují přenos signálu s velmi malými aktefakty. Komůrky jsou umístěny v izolovaném měděném bloku s přesnou kontrolou teploty pomocí Peltierových článků. Součásti měření včetně komůrky, jejich zátek a míchátk jsou vyrobeny z inertních materiálů, které omezují residuální difúzi O₂ na méně než 2 pmol/s/ml při nulovém P_{O₂}. Tento systém umožňuje měření spotřeby velmi malých množství vzorků (1 mg permeabilizovaných buněk, 0,01 mg mitochondriálního proteinu) s limitem detekce 0.5 pmol/s/ml při rovnovážném stavu během 5 minut (pro přehled Gnaiger, 2001).



Obrázek 5: Vnější popis základního modelu Respirometru O2k (Oroboros Instruments). POS, polarografický senzor. Převzato z <https://www.bioblast.at/index.php/File:O2k.jpg>

11 Materiál a metody

11.1 Laboratorní zvířata

V pokusu byli použiti samci potkana kmene Wistar. Potkani byli náhodně ustájeni po dvojicích za standardních podmínek, při světelném režimu L/D = 12/12, teplotě 24 ± 1 °C a přístupu k vodě a krmivu ST1 *ad libitum*. Týden před začátkem experimentu byla všechna zvířata umístěna v karanténě z důvodu habituace a prevence zavlečení nákazy. Zvířata byla podle váhy rozdělena do pěti experimentálních skupin (n = 6 ve skupině):

1. **K** – kontrolní skupina, potkani po celý experiment v místnosti o teplotě 24 ± 1 °C
2. **1D** – akutní chladová skupina, potkani vystaveni teplotě 8 ± 1 °C po dobu 1 dne
3. **3D** – akutní chladová skupina, potkani vystaveni teplotě 8 ± 1 °C po dobu 3 dnů
4. **10D** – akutní chladová skupina, potkani vystaveni teplotě 8 ± 1 °C po dobu 10 dnů
5. **CA** – chronická chladová skupina, potkani 1 týden vystaveni teplotě 8 ± 1 °C intermitentně (8 h/denně), následovaly 4 týdny nepřetržité aklimace při stejné teplotě

11.2 Odběr tkání

Potkani byli uvedeni do hluboké anestézie *i.p.* podáním thiopentalu sodného (60 mg/kg), zváženi a následně, po chirurgickém otevření hrudního koše, usmrceni excizí srdce. Srdce byla zpracována v rámci dalších experimentů. *Post mortem* skrze incizi v kůži na zádech potkana (asi 8 cm kaudálně od kohoutku) byl kompaktní BAT v rychlosti odebrán z mezilopatkové oblasti a okamžitě opláchnut ponořením do ledového fyziologického roztoku a následně přenesen na chlazený termobloček potažený parafilmem. Na termobločku byl BAT během maximálně 10 min očištěn od nežádoucích tkání jako svalů, vaziva a bílého tuku, lehce osušen na filtračním papíru a zvážen s přesností na 1 mg.

11.2.1 Izolace mitochondrií

Izolovaná a zvážená tkáň byla na vychlazeném termobločku nejemno nastříhána. Nastříhaná tkáň byla přesunuta do předvážené zkumavky s izolačním roztokem (viz příloha 1) a zředěna v poměru 1 mg:9 μ l tak, aby vznikl 10% homogenát. K finální homogenizaci tkáně byl použit skleněný homogenizátor a teflonový píst. Každá homogenizace proběhla šesti šetrnými pomalými tahy skleněného homogenizátoru proti teflonovému pístu rotujícím 700 ot/min. Celá homogenizace probíhala na ledu, abychom předešli tepelnému poškození tkáně. Výsledný homogenát byl následně umístěn do uzavřených zkumavek a centrifugován (centrifuga Hettich Universal 32 R) při 600x g po dobu 10 minut a 4 °C. Výsledný supernatant byl odlit přes sítko

do čistých zkumavek a znovu centrifugován při 8000x g po dobu 10 minut a 4 °C. Výsledným sedimentem byly izolované mitochondrie, které byly resuspendovány v izolačním médiu a uchovávány na ledu pro následná měření. Zbývající vzorky byly rozděleny do aliquotů a zmrazeny v -80 °C pro stanovení koncentrace proteinů a další analýzy.

11.3 Respirometrie

Měření HRR byla provedena pomocí přístroje O2k-respirometr (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko), který máme k dispozici na našem pracovišti. K zobrazení dat na počítači v reálném čase a výpočet spotřeby O₂ byl použit program DatLab stejného výrobce. Před a po každém měření byly měřící komůrky přístroje vymyty pomocí vyřazeného homogenátu tkáně pro vyláčení zejména zbytkových hydrofobních inhibitorů a následně vypláchnuty 96% ethanolem a destilovanou deionizovanou vodou.

Všechna měření byla prováděna ve stejném respiračním médiu (viz příloha 1), za stálého míchání při 25 °C následovně. Do čisté komůrky bylo napipetováno 2,1 ml respiračního média. Po ustálení koncentrace O₂ (asi 10-15 min) byl přístroj kalibrován. Následně byly komůrky uzavřeny odpovídajícími zátkami a bylo možno začít měření podle příslušného protokolu. Množství mitochondrií pro každý protokol bylo stanoveno empiricky a tato dávka v objemu byla konstantní. Další látka byla přidána vždy až po ustálení *plató* fáze předchozí reakce. Mitochondrie, substráty a inhibitory byly přesně pipetovány pomocí mikro-stříkaček Hamilton (každá látka vlastní mikro-stříkačkou jako prevence kontaminací). Koncentrace O₂ během měření byla udržována nad 200 nmol/ml

I. Protokol – Respirace závislá na UCP1

UCP1-závislou respiraci jsme stanovili podle protokolu Porter *et al.* (2016). Nejprve byla stimulována maximální respirace a aktivace UCP1 saturačními koncentracemi substrátů 5 µl 2 M pyruvát (5 mM), 15 µl 200 mM oktanoyl-l-karnitin (1,5 mM), 10 µl 1 M glutamát (10 mM), 5 µl 0,8 M malát (2 mM), 20 µl 1 M sukcinát (10 mM), UCP1 byl následně inhibován saturační koncentrací ADP - 40-60 µl 0,5 M ADP (10-15 mM) do maximální inhibice. Aby nedošlo ke zkreslení výsledné respirace byl po ADP titrován inhibitor ATP-syntázy oligomycin (Omy) po 1 µl krocích 4 mg/ml oligomycinu (2 µg/ml).

II. Protokol – Substrate Uncoupler Inhibitor Titration

SUIT protokol je typ protokolu používaný pro kvantifikaci mitochondriální respirace v nespřaženém, spřaženém a rozpřaženém stavu za pomoci substrátů a inhibitorů pro jednotlivé komplexy a následně s použitím titrace rozpřahovače karbonylkyanid-m-chlorfenylhydrazonu (CCCP). V této práci byl použit protokol pro změření kapacity CI pomocí substrátů 10 μ l 1 M glutamátu (10 mM), 5 μ l 1 M malátu (5 mM) a CII pomocí 20 μ l 1 M sukcinátu (10 mM). Plné spřažení bylo navozeno pomocí 20 μ l 0,5 M ADP (2,5 mM) a 5 μ l 4 mM cytochrom C (0,01 mM). Inhibice CI byla navozena titrací 1 μ l 1mM rotenonu (0,5 μ M), který inhibuje přenos elektronů z železo-sírného centra v CI na CoQ. Dále byla inhibována Fo podjednotka ATP-syntázy titrací 1 μ l 4 mg/ml oligomycinu (2 μ g/ml) a odečtena maximální respirace CII. Nakonec bylo provedeno úplné rozpřažení titrací 1 μ l 0,1 mM CCCP (0,05 μ M) a titrován 1 μ l 5 mM antimycin A (2,5 μ M), který inhibuje Qi místo CIII a je odečtena tzv. reziduální spotřeba kyslíku nezávislá na transportu elektronů (pro přehled Gnaiger, 2020).

11.4 Měření proteinů podle Bradfordové

Aliquoty určené pro stanovení proteinů byly rozmrazeny na ledu a byly v nich dodatečně stanoveny koncentrace proteinů následovně: Nejprve byla připravena kalibrační křivka proteinu s použitím zásobního roztoku BSA [2 mg/ml] (BioRad, USA), který byl naředěn na koncentrace: 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 a 1000 [ng/ μ l]. Následně byly na 96 jamkovou destičku v tripletech po 10 μ l na jamku napipetovány jednotlivé koncentrace BSA společně se dvěma triplety ddH₂O (tzv. Blank). Do těchto jamek bylo následně přidáno 250 μ l činidla Bradfordové (Sigma, B6916), destička byla přikryta celofánem a inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Mitochondriální vzorky byly ředěny v rozmezí dle kalibrační křivky. Naředěné vzorky byly po tripletech přidány na stejnou destičku po 10 μ l na jamku a opět k nim bylo přidáno 250 μ l činidla Bradfordové. Destička byla přikryta a po 10 min inkubaci byla spektrofotometrem (Synergy HT, BioTek) změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Měření bylo provedeno 2x v triplicátech, výchozí hodnoty koncentrací celkového proteinu byly brány jako průměry jednotlivých tripletů a přepočteny s ohledem na ředění vzorků na konečnou koncentraci [mg/ml].

11.5 Statistické vyhodnocení dat

Výstupní data z respirometrie byla nejprve vyhodnocena pomocí programu Oroboros DatLab 5, kde byly odečítány hodnoty z *plató* fáze každé reakce. Tato data byla následně zpracována v programu MS Excel, kde byla respirace v [pmol O₂/s/ml] podle dat z metody Bradfordové

normalizována na [pmol O₂/s/mg] mitochondriálního proteinu v daném vzorku. Hmotnostní parametry a data z respirometrie byly statisticky hodnoceny. Ke statistické analýze byl použit program GraphPad Prism 8, metoda One-Way ANOVA a Tukey *post hoc* test. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p \leq 0,05$.

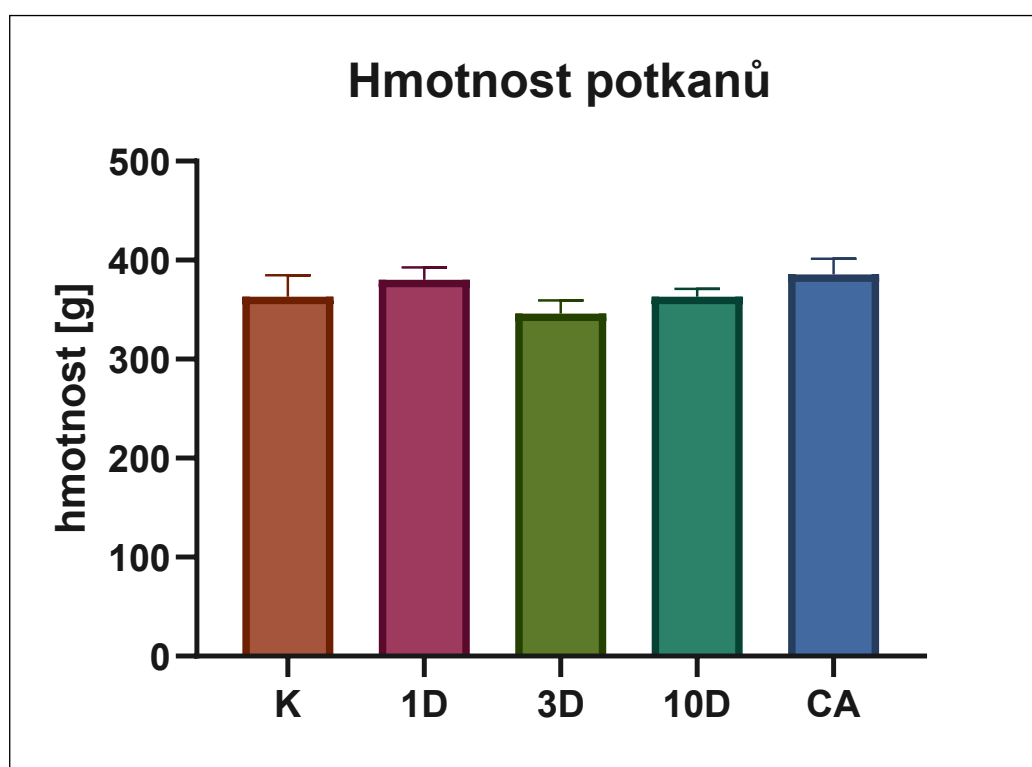
12 Cíle

Cílem diplomové práce bylo porovnat mitochondriální respiraci izolovaných mitochondrií z hnědé tukové tkáně u kontrolních potkanů (24 ± 1 °C) a u potkanů po jednom, třech a deseti dnech akutní mírné chladové expozice (8 ± 1 °C) a po pěti týdnech chronické mírné chladové aklimace (8 ± 1 °C).

14 Výsledky

14.1 Tělesná hmotnost zvířat

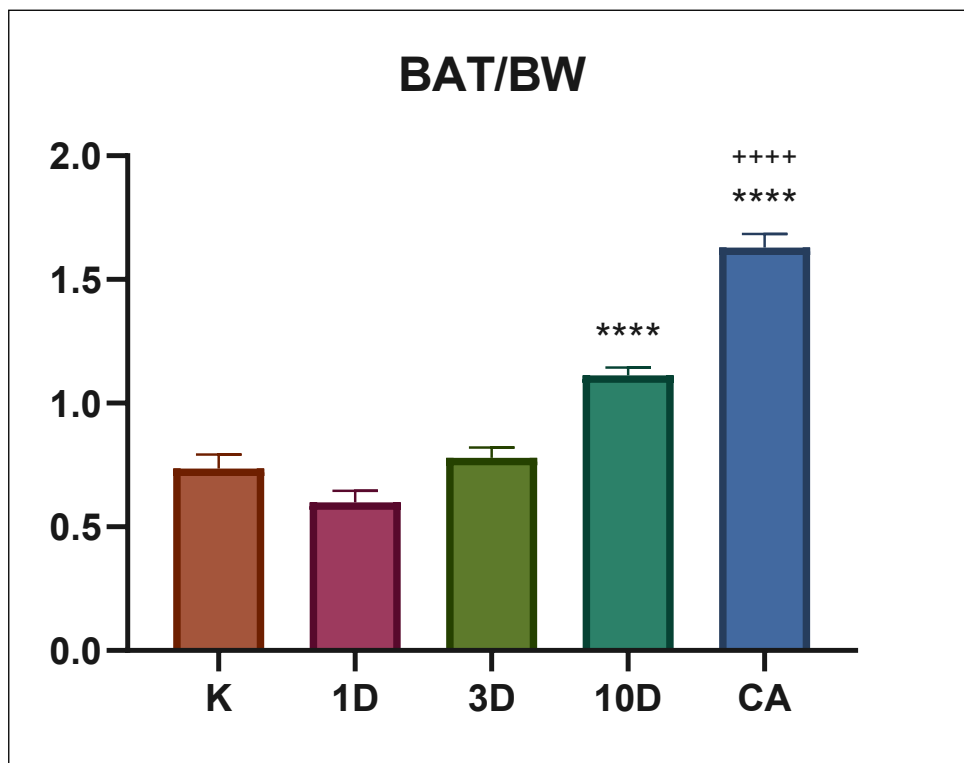
Potkani byli zváženi po jejich přijetí do zvěřince a následně pravidelně 1x týdně až do konce experimentu. Hmotnosti potkanů zvážených v den odběru tkání znázorňuje Graf 1. Průměrné hmotnosti potkanů činily 363 ± 21 g pro skupinu K, 380 ± 12 g pro skupinu 1D, 346 ± 13 g pro skupinu 3D, 363 ± 8 g pro skupinu 10D a 386 ± 16 g pro skupinu CA. Mezi skupinami nebyly prokázány statisticky signifikantní rozdíly



Graf 1: Hmotnosti [g] potkanů v den odběru tkání. Kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA) Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test. Mezi skupinami nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl. Hodnoty vyjadřují průměr \pm SEM, $n = 6$.

14.2 Hmotnost hnědé tukové tkáně

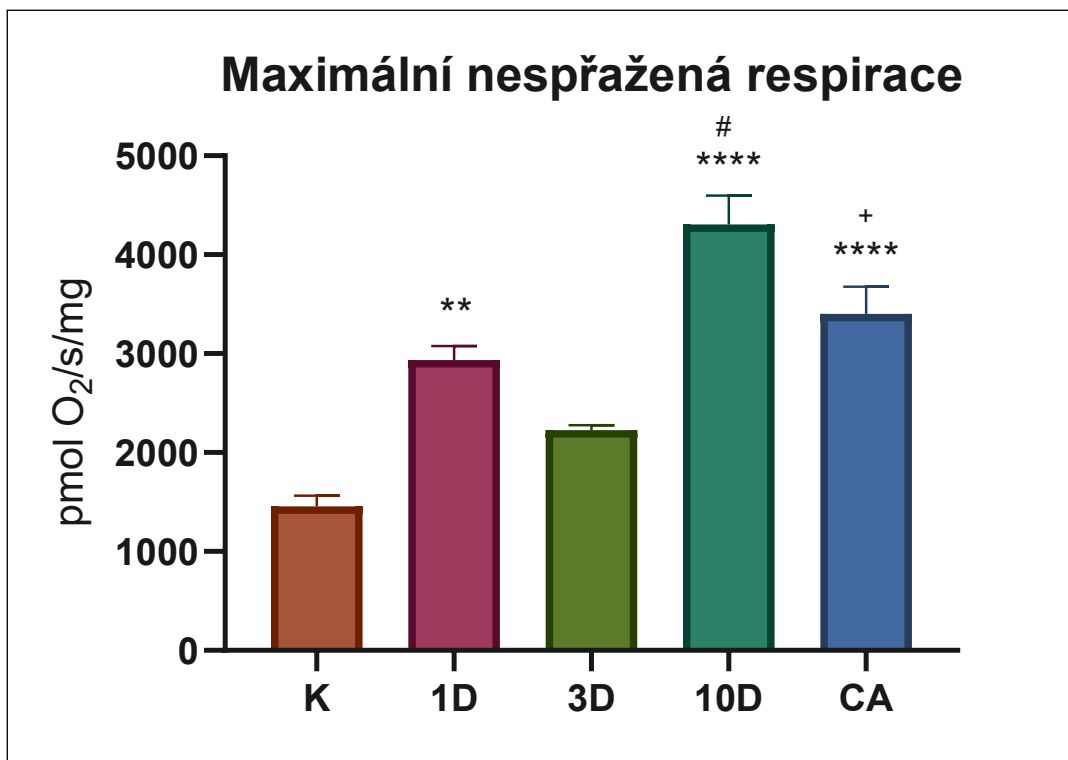
Nárůst interskapulárního ložiska BAT u potkana se často používá jako nepřímý ukazatel úspěšné chladové aklimace. Výsledky zobrazuje Graf 2, vyjadřují relativní hmotnost odebraného BAT v mg vztaženou na tělesnou hmotnost (BW) v g. První signifikantní nárůst oproti kontrole pozorujeme po 10 dnech a to o 51 % a po 5 týdnech až o 121,5 %. Zároveň mezi 10 dny a 5 týdny došlo k signifikantnímu nárůstu o 46 %. Skupiny 1D a 3D se signifikantně neliší proti kontrole ani mezi sebou, přestože u skupiny 1D vidíme mírný pokles.



Graf 2: Relativní hmotnost BAT u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako poměr mezi hmotností BAT a tělesnou hmotností. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr \pm SEM, $n = 6$, **** $p \leq 0,0001$ vs K; +**** $p \leq 0,0001$ vs 10D.

14.3 Maximální nespřažená respirace (Protokol I)

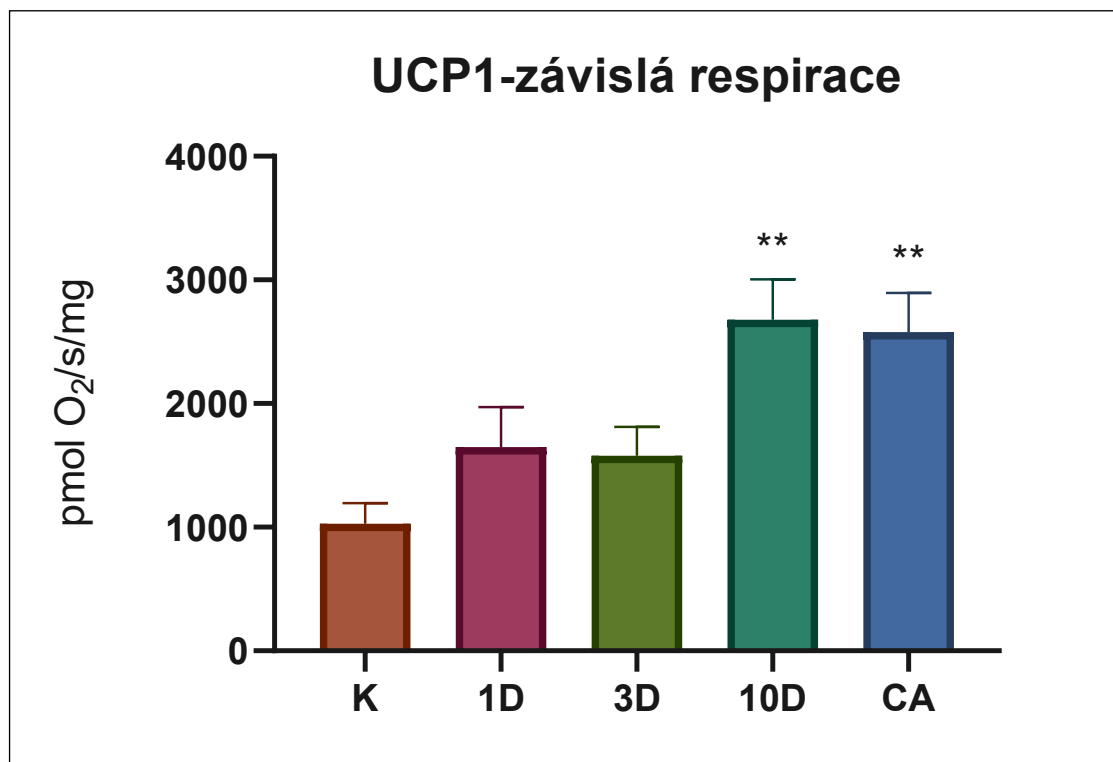
Největší složkou této respirace v mitochondriích BAT je aktivita UCP1 (Graf 4), ale přispívají i mechanismy tzv. LEAK respirace (Graf 5). Po 1 dni v chladu došlo k výraznému nárůstu této respirace o 101 % proti kontrole. Naproti tomu po 3 dnech se neprokázal signifikantní nárůst oproti kontrole, a dokonce vidíme návrat ke kontrolní hodnotě. Mezi 3 a 10 dny dochází opět k nárůstu o 93 % a k celkovému nárůstu o 195 % oproti kontrole. V 5 týdnech respirace signifikantně klesá o 21 % oproti 10 dnům, ale stále je výrazně zvýšená oproti kontrole o 133 %.



Graf 3: Maximální nespřažená respirace izolovaných mitochondrií BAT u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako spotřeba kyslíku v pmol za sekundu na miligram mitochondriálního proteinu. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr ± SEM, n = 5, ** $p \leq 0,01$ vs K, **** $p \leq 0,0001$ vs K; # $p \leq 0,0001$ vs 3D; + $p \leq 0,05$ vs 10D.

14.4 UCP1-závislá respirace (Protokol I)

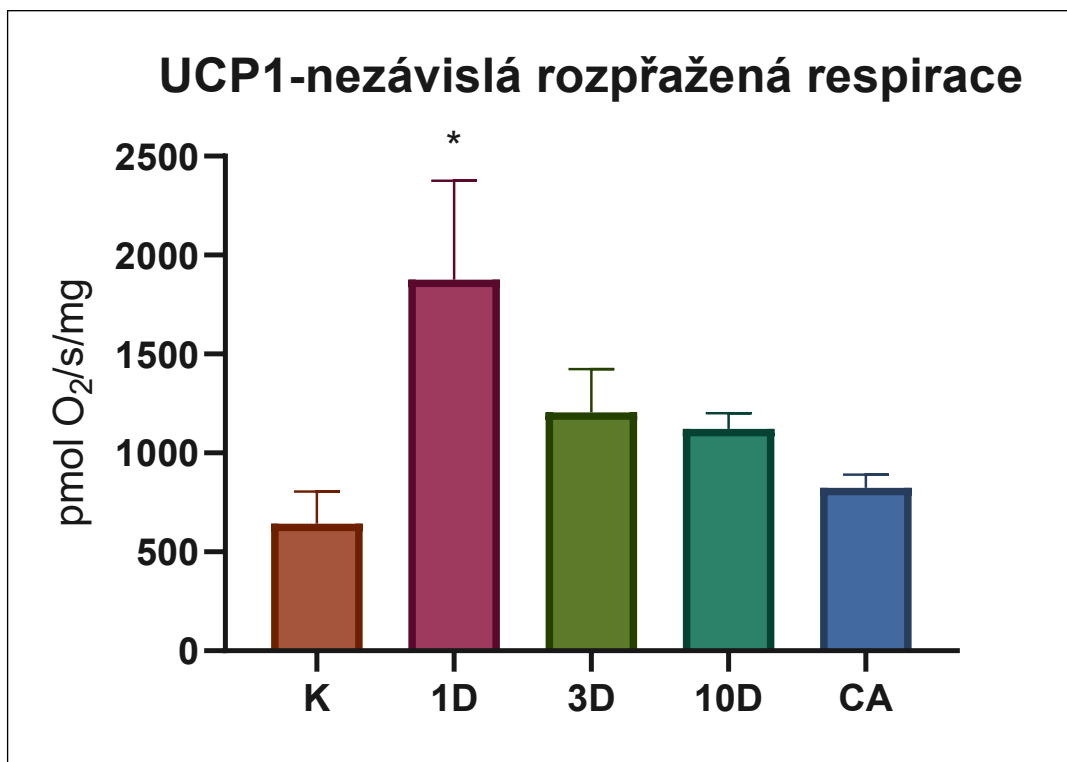
Největší složkou nespřažené respirace mitochondrií BAT je UCP1-závislá respirace (Graf 4), která byla odečtena z rozdílu hodnot maximální nespřažené respirace (Graf 3) a po následné inhibici UCP1 pomocí titrace vysoké koncentrace ADP zbylé rozpřažené respirace, která je uvedena v Grafu 5. Po 1 a 3 dnech v chladu pozorujeme nesignifikantní nárůst oproti kontrolám. Po 10 dnech už jsme zaznamenali signifikantní nárůst respirace o 160 %, který přetrvává i po 5 týdnech, kde byla UCP1-závislá respirace zvýšená o 150 % oproti kontrole.



Graf 4: UCP1-dependentní respirace izolovaných mitochondrií BAT u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako spotřeba kyslíku v pmol za sekundu na miligram mitochondriálního proteinu. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr ± SEM, n = 5, **p ≤ 0,01 vs K.

14.5 UCP1-nezávislá rozpřažená respirace (Protokol I)

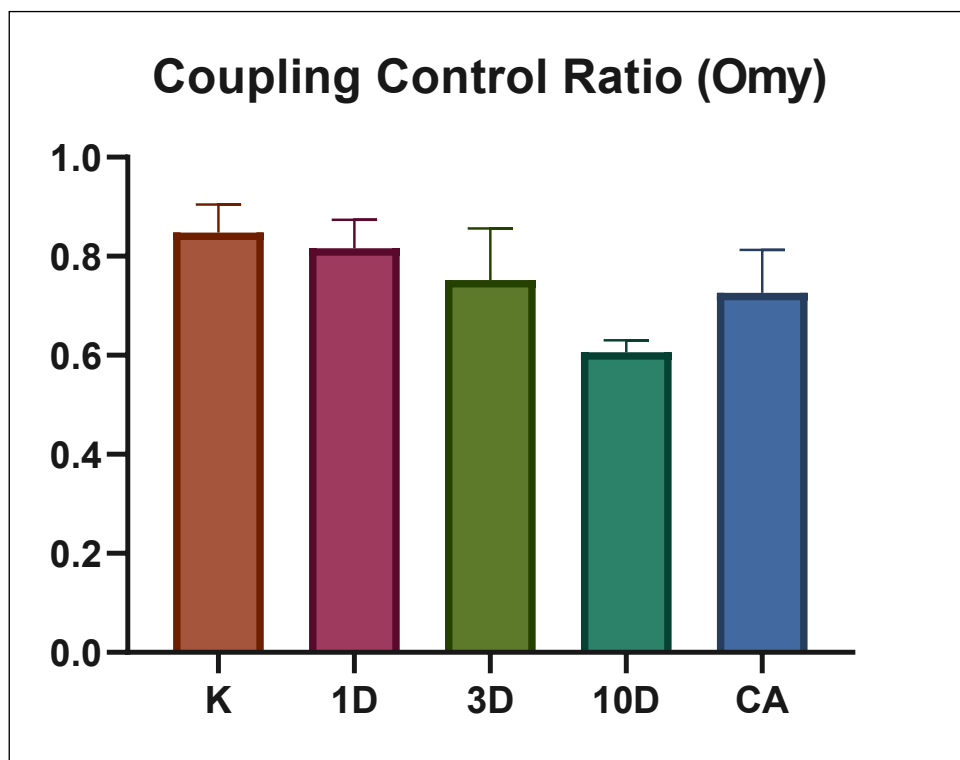
Respirace kompenzující únik protonů a elektronů alternativními mechanismy, tzv. proton slip, proton leak a electron leak (Graf 5). Lze ji odečíst po inhibici UCP1 pomocí vysoké koncentrace ADP a následné inhibici ATP-syntázy pomocí oligomycinu. Dochází k rozpřažení ETC od oxidativní fosforylace a úniku protonů a elektronů do mitochondriální matrix. Po 1 dni v chladu pozorujeme signifikantní nárůst o 192 % oproti kontrolám, u dalších skupin pak postupný klesající trend bez signifikancí.



Graf 5: Rozpřažená respirace izolovaných mitochondrií BAT po inhibici UCP1 a podání oligomycinu u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako spotřeba kyslíku v pmol za sekundu na miligram mitochondriálního proteinu. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr ± SEM, $n = 5$, $*p \leq 0,05$ vs K.

14.6 Coupling control ratio pro oligomycin (Protokol I)

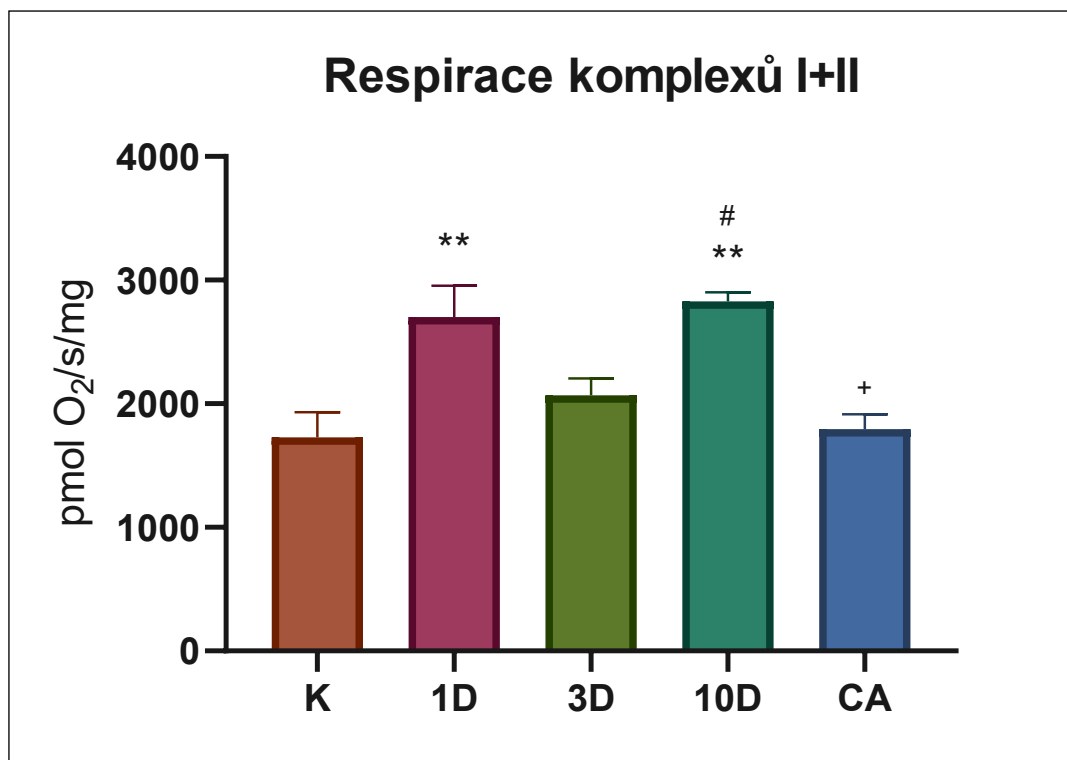
Tzv. coupling control ratio (CCR) pro Omy můžeme parafrázovat jako míru spřaženosti mitochondrií vyjádřenou jako poměr mezi hodnotami spotřeby O_2 po podání Omy a po podání ADP (Omy/ADP). Nižší hodnota znamená větší citlivost na Omy, tím pádem větší spřaženost, respektive větší aktivitu ATP-syntázy. V průběhu aklimace vidíme klesající trend, který je nejvyšší u skupiny 10D u chronické skupiny CA hodnoty znovu rostou.



Graf 7: CCR pro oligomycin izolovaných mitochondrií BAT u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako spotřeba kyslíku v pmol za sekundu na miligram mitochondriálního proteinu. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr \pm SEM, $n = 5$.

14.7 Respirace komplexů I+II (Protokol II)

Společná maximální spřažená respirace CI+II po podání substrátů a nízké koncentrace ADP (Graf 6). Po 1 dni v chladu byl zaznamenán signifikantní nárůst o 56 % oproti kontrole. Po 3 dnech dochází k poklesu, který je následován opětovným vzrůstem po 10 dnech o 37 % proti 3 dnům a celkově o 63,5 % oproti kontrole. Mezi 10 dny a 5 týdnů dochází k významnému poklesu o 37 % na úroveň kontrol.



Graf 6: Maximální spřažená respirace CI+II izolovaných mitochondrií BAT u kontrolních potkanů (K), akutně chladově exponovaných 1 den, 3 dny, 10 dní (1D, 3D, 10D) a 5 týdnů chladově aklimovaných potkanů (CA), vyjádřena jako spotřeba kyslíku v pmol za sekundu na miligram mitochondriálního proteinu. Hodnoty byly statisticky analyzovány metodou One-Way ANOVA, Tukey post hoc test, hodnoty vyjadřují průměr \pm SEM, $n = 5$, $**p \leq 0,01$; $\#p \leq 0,05$ vs 3D; $+p \leq 0,01$ vs 10D.

15 Diskuze

Ve této práci jsem navázal na výzkum dříve provedený v naší laboratoři zaměřující se na fyziologii mírné chladové aklimace. Nedávno jsme publikovali práci, která ukazuje, že potkani vystaveni mírnému chladu 8 ± 1 °C po dobu 5 týdnů vykazují kardioprotektivní fenotyp, který signifikantně zmenšuje velikost infarktu myokardu a zároveň chrání srdeční mitochondrie před vápenatým přetížením, bez prokazatelných nežádoucích účinků (Tibenska *et al.*, 2020). Naše další výsledky v připravované publikaci Marvanová *et. al.* demonstrují, že k navození kardioprotektivního fenotypu dochází již po 3 a 10 dnech vystavení mírnému chladu. Mým cílem bylo analyzovat funkčnost izolovaných mitochondrií BAT pomocí metody HRR v průběhu chladové aklimace potkanů v intervalech 1 den, 3 dny, 10 dní a 5 týdnů a porovnat je mezi sebou. Mé výsledky ukázaly, že dochází k signifikantnímu zvýšení respirace již po 1 dni chladové expozice. K signifikantnímu nárůstu relativní hmotnosti BAT (BAT/BW), který je často používán jako ukazatel chladové aklimace dochází ovšem až po 10 dnech. Průměrná hodnota BAT/BW byla po 10 dnech zvýšena o 51 % a po 5 týdnech dokonce o 121,5 % oproti kontrole. V době mezi 10 dny a 5 týdny tak došlo k významnému nárůstu o 46 %. Růst BAT úměrně k délce chladové expozice je v souladu s řadou přechozích prací (Cameron & Smith, 1964; van der Lans *et al.*, 2013).

Asi nejdůležitější vlastností BAT je schopnost termogeneze, která byla stanovena pomocí protokolu I. V našem případě vyjadřuje termogenní kapacitu maximální nespřažená respirace, tedy respirace, která nevede ke tvorbě ATP a místo toho disipuje energii ve formě tepla. Výsledky této respirace ukazují jasné maximum v 10 dnech. V průběhu chladové expozice jsem zaznamenal dvojnásobnou respiraci po 1 dni a téměř trojnásobnou po 10 dnech ve srovnání s kontrolou. Zajímavé je, že mezi 1 a 3 dny dochází k poklesu respirace, která je následně v 10 dnech navýšena o 93 %. K dalšímu významnému poklesu o 26 % dochází mezi 10 dny a 5 týdny. Je dobře známo, že hlavní složkou termogeneze BAT je aktivita UCP1. Mé výsledky ukazují nesignifikantní zvýšení UCP1-závislé respirace po 1 dni oproti kontrole a podobně žádnou významnou změnu ani po 3 dnech. Signifikantní zvýšení jsem zaznamenal až po 10 dnech o 160 % oproti kontrole. Takto vysoko přetrvává UCP1-závislá respirace až do 5 týdnů kde je stále zvýšena o 150 % oproti kontrole. Hodnoty naměřené po 10 dnech podporuje nedávná práce Sepa-Kishi *et al.* (2019), která popisuje více než trojnásobné množství UCP1 v BAT u potkanů po 7 dnech ve 4 °C.

Je pozitivní, že hodnoty zůstávají srovnatelně zvýšené i po 5 týdnech a nedochází k jejich poklesu například z důvodu chronického stresu (Thuzar *et al.*, 2018). Výsledky z kratších expozic nicméně nesouhlasí s literaturou. Trayhurn *et al.* (1987) zjistili, že potkani vystaveni teplotě 4 °C okamžitě zvyšují svoji termogenní aktivitu skrze akutní stimulaci UCP1 a do 48 hod u nich dochází k nárůstu termogenní kapacity díky zvýšené expresi UCP1. Pro to, že jsem do 3 dnů nezaznamenal žádné signifikantní zvýšení respirace UCP1 se nabízí jedno pravděpodobné vysvětlení. Signifikantní nárůst UCP1-závislé respirace mezi kontrolou, 1D a 3D může být zamaskován zvýšenou aktivitou UCP1 u kontrol. Kontrolní zvířata byla chována v teplotě 24 °C což je několik stupňů pod termoneutrální zónou potkana. (27-30 °C). Je doloženo, že k významné třesové termogenezi u potkana dochází již kolem hranice 20 °C lze očekávat, že při teplotě 24 °C dochází ke zvýšení metabolického obratu a BAT může být do určité míry aktivován (pro přehled Gordon, 1990).

Rozpražená respirace nezávislá na UCP1 po inhibici UCP1 a ATP-syntázy je spotřeba O₂ kompenzující tzv. proton leak, proton slip a electron leak. Mé výsledky ukazují významné zvýšení po 1 dni chladové expozice o 192 % oproti kontrole a následný pokles až do 5 týdnů kde je respirace téměř na úrovni kontroly. Abychom lépe pochopili tyto výsledky je potřeba si blíže představit jednotlivé mechanismy tohoto typu respirace. „Proton leak“ je vlastnost vnitřní mitochondriální membrány, protony se mohou do matrix dostat pasivně přímo skrz fosfolipidovou dvojvrstvu pomocí tzv. vodních drátů, mohou difundovat skrz membránové proteiny, nebo okolo nich v závislosti na protonmotivní síle. Kromě UCP1 může být jejich difúze facilitována adeninnukleotidtranslokázou (ANT) (Martin D Brand *et al.*, 2005; Röpke, Saura *et al.*, 2020). Mitochondriální „proton leak“ může pohánět fyziologicky významnou respiraci. Je odpovědný za asi 20-30 % klidové spotřeby O₂ u izolovaných hepatocytů a asi 50 % klidové respirace u perfundovaného kosterního svalu potkana (M D Brand, 1990; Rolfe & Brand, 1996). „Proton slip“ je vlastnost protonových pump (CI, III a IV), skrz které protony „proklouzávají“ do matrix za podmínek vysoké protonmotivní síly (Wikström & Springett, 2020). Bohužel neexistují data, se kterými bychom mohli porovnat námi pozorovaný nárůst respirace po 1 dni v chladu a podpořit tak, nebo vyvrátit roli mechanismů „proton leak a proton slip“. Zůstává tedy k diskusi mechanismus „electron leak“, který vede k produkci ROS. Chouchani *et al.* (2016) ukázali, že v BAT myši vystavených akutnímu chladu (3 h ve 4 °C) dochází k výraznému nárůstu ROS. Autoři tuto skutečnost vysvětlují jako nezbytnou signalizaci pro aktivaci termogeneze, protože farmakologická deplece mitochondriálních ROS vedla po vystavení chladu k hypotermii. Dále zjistili, že ROS během akutní termogeneze

modifikují UCP1 sulfonylací cysteinového zbytku 253 (Cys253), což vede ke zvýšené sensibilaci UCP1 k aktivaci. Je možné, že během 1. dne vystavení chladu dochází k výše popsané aktivaci a modifikaci termogenního systému, která přetrvává do pozdějších stádií. Zvýšená hladina ROS ve velmi akutní fázi chladové aklimace může hrát roli v procesech vývoje BAT a stimulace jeho autokrinní a parakrinní signalizace batokiny, jak je popsáno v kapitole 7.1. Další možností je produkce ROS vyvolaná inhibicí UCP1 v průběhu našeho měření. Bylo zjištěno, že inhibice UCP1 vede ke zvýšení produkce ROS v mitochondriích myšičního BAT (Dlasková *et al.*, 2010). Pokud by se jednalo o zvýšení produkce ROS po 1 dni v chladu způsobené experimentálně, jejich následující postupný pokles od 1 dne do 5 týdnů by mohl souviset s postupně rozvíjející se antioxidační ochranou. Indukce antioxidačního systému působením chladu byla dříve popsána. Autoři zaznamenali zvýšenou aktivitu glutathionového systému v BAT potkanů, nicméně měření prováděli v 35, 75 a 105 dnech chladové aklimace (Spasić *et al.*, 1993). Jasným záměrem do budoucna je zaměřit se konkrétně na tvorbu ROS a rozvoj antioxidačního systému během našeho protokolu mírné chladové adaptace a ověřit výše zmíněné teorie.

Pokud se vrátíme k maximální nespřažené respiraci můžeme ji shrnout následovně: nárůst respirace po 1 dni v chladu je způsoben složkou UCP1-nezávislé rozpřažené respirace, pokles ve 3 dnech je způsoben poklesem UCP1-nezávislé složky oproti 1 dni a neměnnou UCP1-závislou respirací, po 10 dnech nastává obrat a začne převládat složka UCP1-závislé respirace, po 5 týdnech se pak mírný pokles UCP1-závislé a nezávislé respirace projevuje jako pokles celkové respirace oproti 10 dním. Poslední parametr, který byl změřený v protokolu I je tzv. CCR pro oligomycin. Díky tomu, že jsem k inhibici UCP1 použil ADP místo klasicky používaného GDP, jsem dostal příležitost následnou titrací inhibitoru ATP-syntázy oligomycinu odečíst její funkci. CCR je v tomto případě poměr respirací po a před podáním Omy a vyjadřuje míru spřaženosti. Pokud je CCR roven 1, to by znamenalo, že mitochondrie jsou zcela rozpřažené a inhibice ATP-syntázy nemá žádný vliv na respiraci. Takových hodnot ovšem nedosahuje ani BAT. Přestože má oproti ostatním tkáním BAT mnohem méně zastoupenou ATP-syntázu, ta pořád vykazuje určitou aktivitu a mitochondrie nejsou nikdy 100% rozpřažené (Porter *et al.*, 2016). Přestože nebyla prokázána statistická významnost, můžeme v 10 dnech pozorovat výrazný pokles CCR na hranici 0,6. Tento pokles je zajímavý, protože se vyskytuje u skupiny, která měla zároveň největší aktivitu UCP1. Je však možné, že právě zvýšená aktivita UCP1 vysvětluje zvýšenou aktivitu ATP-syntázy. Bylo ukázáno, že metabolity mastných kyselin způsobují na koncentraci závislou inhibici ATP-syntázy (Abdul-

Ghani *et al.*, 2008). Odstranění většího množství těchto metabolitů díky větší termogenní aktivitě by se tak mohlo po inhibici UCP1 projevit zvýšením aktivity ATP-syntázy.

Posledními prezentovanými výsledky je společná respirace CI a II změřená protokolem II. Na rozdíl od protokolu I zde nedochází k aktivaci UCP1 a jedná se tedy o spřaženou respiraci. Výsledky ukazují signifikantní zvýšení po 1 dni o 56 % a po 10 dnech o 63,5 % oproti kontrole, ale nikoliv po 3 dnech a 5 týdnech. Latorre-Muro *et al.* (2021) ve svojí nové práci identifikovali v BAT novou chladem aktivovanou meziorganelovou osu, která zvyšuje respiraci mitochondrií pomocí importu mitochondriálního proteinu a následného nárůstu nových krist, to by mohlo být jedno z vysvětlení pro zvýšenou respiraci CI a II, kterou pozorujeme po 1 a 10 dnech, ale i ostatních složek mitochondriální respirace. V připravované práci Marvanové *et al.* jsou prezentovány mikrofotografie zobrazující morfologii BAT v průběhu chladové aklimace. Od 1 dne do 10 dnů dochází k jednoznačnému „zkvalitnění“ tkáně, to znamená, že přibývá mitochondrií a velké tukové kapénky se mění na malé (podobně jako na Obr. 1 v kapitole 3.1.1). V 5 týdnech však dochází k regresi této morfologie, která připomíná spíše kontrolu. Tato regrese, přestože zatím nemá jasnou příčinu může vysvětlovat nejenom signifikantní pokles respirace CI a II o 57 % mezi 10 dny a 5 týdny, ale i pokles mezi maximální nespřažené respirace mezi 10 dny a 5 týdny (Graf 4). Zatím nemáme zatím žádné další výsledky, které by podpořily pokles respirace CI a II ve 3 dnech, proto budeme ve studiu pokračovat.

16 Závěr

V průběhu modelu mírné chladové aklimace použité v této práci jednoznačně dochází u potkanů k rozvoji velikosti BAT se signifikantním nárůstem již v 10 dnech a s více než dvojnásobnou velikostí po 5 týdnech ve srovnání s potkany chovanými v teple. Metodou HRR byly z izolovaných mitochondrií BAT změřeny hodnoty maximální nespřažené respirace, která tvoří hlavní složku netřesové termogeneze produkované touto tkání. Výsledky ukázali, že tato respirace stoupá již po 1 dni chladové expozice, po 3 dnech se navrátila ke kontrolní hodnotě a následovalo její maximum po 10 dnech v chladu. Tento efekt přetrval téměř až do konce protokolu, kde byly po 5 týdnech naměřeny druhé nejvyšší hodnoty, přestože došlo k poklesu o pětinu oproti hodnotám v 10 dnech. Signifikantní zvýšení nespřažené respirace po 1 dni přináší zajímavý problém ve formě potenciálně zvýšené produkce ROS. Podrobné prozkoumání a pochopení tohoto fenoménu by mohlo přinést užitečné informace o změnách redoxní rovnováhy a antioxidantního systému v odpovědi na nízkou teplotu prostředí. Výsledky CCR a jeho pokles po 10 dnech by mohl znamenat, že ATP-syntáza může mít během aklimace na chlad v mitochondriích BAT větší roli, než se původně předpokládalo. Následné měření spřažené respirace CI a II předchozí výsledky nejsou postačující pro vyjasnění mechanismu vysvětlujícího nálezy UCP1 respirace. Zde pozorujeme signifikantní nárůst respirace po 1 a 10 dnech, ale pokles po 3 dnech a 5 týdnech, ke kterým zatím nemáme jasná vysvětlení. Z těchto výsledků lze nicméně vyvodit, že nejvyšší respirační kapacity v přepočtu na 1 mg mitochondriálního proteinu dosahují mitochondrie BAT po 10 dnech expozice potkanů teplotě 8 ± 1 °C.

Neexistují práce, které by se zabývaly měřením stejných parametrů mitochondriální respirace BAT v takových intervalech chladové aklimace jako v této práci. Přestože se velká část výkladu výsledků opírá o nepřímé důkazy a osobní domněnky, jsou výsledky této práce dostatečné na to, aby nás nasměrovaly, jak postupovat při jejich upřesňování a pochopení. A zároveň fungují jako velmi zajímavý úvod do problematiky respirace BAT v rozvoji mírné chladové aklimace. Pochopení změn, kterými mitochondrie během chladové aklimace prochází by nás mohlo výrazně posunout k pochopení souvislostí komplexních v změn organismu a napomoci nalezení podstaty například tolik zajímavého kardioprotektivního fenotypu vyvolaného mírným chladem.

17 Seznam literatury

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou.

- Abdul-Ghani, M. A., Muller, F. L., Liu, Y., Chavez, A. O., Balas, B., Zuo, P., Chang, Z., Tripathy, D., Jani, R., Molina-Carrion, M., Monroy, A., Folli, F., Van Remmen, H., & DeFronzo, R. A. (2008). Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(3), E678-85.
- Arch, J. R., Ainsworth, A. T., Cawthorne, M. A., Piercy, V., Sennitt, M. V, Thody, V. E., Wilson, C., & Wilson, S. (1984). Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, 309(5964), 163–165.
- Asano, A., Kimura, K., & Saito, M. (1999). Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 61(4), 403–409.
- Atit, R., Sgaier, S. K., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D., Joyner, A. L., Niswander, L., & Conlon, R. A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Developmental Biology*, 296(1), 164–176.
- Bal, N. C., Maurya, S. K., Sopariwala, D. H., Sahoo, S. K., Gupta, S. C., Shaikh, S. A., Pant, M., Rowland, L. A., Bombardier, E., Goonasekera, S. A., Tupling, A. R., Molkentin, J. D., & Periasamy, M. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nature Medicine*, 18(10), 1575–1579.
- Barcroft, J., & Haldane, J. S. (1902). A method of estimating the oxygen and carbonic acid in small quantities of blood. *The Journal of Physiology*, 28(3), 232–240.
- Befroy, D. E., Petersen, K. F., Dufour, S., Mason, G. F., Rothman, D. L., & Shulman, G. I. (2008). Increased substrate oxidation and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of endurance-trained individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16701–16706.
- Berg, F., Gustafson, U., & Andersson, L. (2006). The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genetics*, 2(8), e129.

- Bianco, A. C., & Silva, J. E. (1987). Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation. *The American Journal of Physiology*, 253(3 Pt 1), E255-63.
- *Billon, N., Monteiro, M. C., & Dani, C. (2008). Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biology of the Cell*, 100(10), 563–575.
- Blondin, D. P., Labbe, S. M., Tingelstad, H. C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guerin, B., Turcotte, E. E., Carpentier, A. C., Richard, D., & Haman, F. (2014). Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(3), E438-46.
- Boon, M. R., Kooijman, S., van Dam, A. D., Pelgrom, L. R., Berbée, J. F. P., Visseren, C. A. R., van Aggele, R. C., van den Hoek, A. M., Sips, H. C. M., Lombès, M., Havekes, L. M., Tamsma, J. T., Guigas, B., Meijer, O. C., Jukema, J. W., & Rensen, P. C. N. (2014). Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. *The FASEB Journal*, 28(12), 5361–5375.
- Brand, M D. (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1018(2–3), 128–133.
- Brand, Martin D, Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S., & Cornwall, E. J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *The Biochemical Journal*, 392(Pt 2), 353–362.
- Burýsek, L., & Houstek, J. (1997). beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Letters*, 411(1), 83–86.
- Cameron, I. L., & Smith, R. E. (1964). Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. *Journal of Cell Biology*, 23(1), 89–100.
- Chartoumpekis, D. V, Habeos, I. G., Ziros, P. G., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Papavassiliou, A. G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7–8), 736–740.

- Chondronikola, M., Volpi, E., Borsheim, E., Porter, C., Annamalai, P., Enerback, S., Lidell, M. E., Saraf, M. K., Labbe, S. M., Hurren, N. M., Yfanti, C., Chao, T., Andersen, C. R., Cesani, F., Hawkins, H., & Sidossis, L. S. (2014). Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, *63*(12), 4089–4099.
- Chouchani, E. T., Kazak, L., Jedrychowski, M. P., Lu, G. Z., Erickson, B. K., Szpyt, J., Pierce, K. A., Laznik-Bogoslavski, D., Vetrivelan, R., Clish, C. B., Robinson, A. J., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2016). Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, *532*(7597), 112–116.
- Clark, L. C. J., Wolf, R., Granger, D., & Taylor, Z. (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology*, *6*(3), 189–193.
- Connolly, E., Nånberg, E., & Nedergaard, J. (1986). Norepinephrine-induced Na⁺ influx in brown adipocytes is cyclic AMP-mediated. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(31), 14377–14385.
- Cottle, W. H., & Carlson, L. D. (1956). Regulation of Heat Production in Gold-Adapted Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *92*(4), 845–849.
- *Crichton, P. G., Lee, Y., & Kunji, E. R. (2017). The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*, *134*, 35–50.
- DeGroot, D. W., & Kenney, W. L. (2007). Impaired defense of core temperature in aged humans during mild cold stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*(1), R103–R108.
- Desautels, M., Zaror-Behrens, G., & Himms-Hagen, J. (1978). Increased purine nucleotide binding, altered polypeptide composition, and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold-acclimated rats. *Canadian Journal of Biochemistry*, *56*(6), 378–383.
- Dlasková, A., Clarke, K. J., & Porter, R. K. (2010). The role of UCP 1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(8), 1470–1476.
- Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E., & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, *387*(6628), 90–94.

- Eyolfson, D. A., Tikuisis, P., Xu, X., Weseen, G., & Giesbrecht, G. G. (2001). Measurement and prediction of peak shivering intensity in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 84(1), 100–106.
- Fain, J. N., Mohell, N., Wallace, M. A., & Mills, I. (1984). Metabolic effects of beta, alpha 1, and alpha 2 adrenoceptor activation on brown adipocytes isolated from the perirenal adipose tissue of fetal lambs. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 33(3), 289–294.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *CELL*, 151(2), 400–413.
- Fernandez, J. A., Mampel, T., Villarroya, F., & Iglesias, R. (1987). Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *The Biochemical Journal*, 243(1), 281–284.
- Forner, F., Kumar, C., Lubber, C. A., Fromme, T., Klingenspor, M., & Mann, M. (2009). Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metabolism*, 10(4), 324–335.
- Foster, D. O., & Frydman, M. L. (1979). Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(3), 257–270.
- García-Alonso, V., & Clària, J. (2014). Prostaglandin E2 signals white-to-brown adipogenic differentiation. *Adipocyte*, 3(4), 290–296.
- *Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*, 128(3), 277–297.
- *Gnaiger, E. (1983a). Heat dissipation and energetic efficiency in animal anoxibiosis: Economy contra power. *Journal of Experimental Zoology*, 228(3), 471–490.
- *Gnaiger, E. (1983b). *The Twin-Flow Microrespirometer and Simultaneous Calorimetry BT - Polarographic Oxygen Sensors*
- *Gnaiger, Erich. (2020). Mitochondrial pathways and Respiratory control. *Bioenergetics communications* (Vol. 2).

- *Gordon, C. J. (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiology & Behavior*, 47(5), 963–991.
- Gunawardana, S. C., & Piston, D. W. (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes*, 61(3), 674–682.
- *Hammel, H. T. (1968). Regulation of internal body temperature. *Annual Review of Physiology*, 30, 641–710.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–1263.
- Heaton, G. M., Wagenvoord, R. J., Kemp, A. J., & Nicholls, D. G. (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *European Journal of Biochemistry*, 82(2), 515–521.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 279(3), C670-81.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L. R., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G., & Smith, M. A. (2001). Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 21(9), 3017 LP – 3023.
- Hirata, K. (1982). Blood flow to brown adipose tissue and norepinephrine- induced calorogenesis in physically trained rats. *The Japanese Journal of Physiology*, 32(2), 279–291.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., & Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 12983–12990.

- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R., & Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metabolism*, 11(3), 206–212.
- Houmard, J. A., Weidner, M. L., Gavigan, K. E., Tyndall, G. L., Hickey, M. S., & Alshami, A. (1998). Fiber type and citrate synthase activity in the human gastrocnemius and vastus lateralis with aging. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 85(4), 1337–1341.
- Hsieh, A. C., Carlson, L. D., & Gray, G. (1957). Role of the sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. *The American Journal of Physiology*, 190(2), 247–251.
- Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J. P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., Tajima, K., Ajuwon, K. M., Soga, T., & Kajimura, S. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nature Publishing Group*, 23(12).
- *Ikeda, K., Maretich, P., & Kajimura, S. (2018). The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, xx, 1–10.
- Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Kanemura, N., Ogawa, H., Daida, H., Murohara, T., & Ouchi, N. (2015). FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(1), 124–130.
- Kazak, L., Chouchani, E. T., Jedrychowski, M. P., Erickson, B. K., Shinoda, K., Cohen, P., Vetrivelan, R., Lu, G. Z., Laznik-Bogoslavski, D., Hasenfuss, S. C., Kajimura, S., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell*, 163(3), 643–655.
- Kent-Braun, J. A., & Ng, A. V. (2000). Skeletal muscle oxidative capacity in young and older women and men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 89(3), 1072–1078.

- Klepac, K., Kilić, A., Gnad, T., Brown, L. M., Herrmann, B., Wilderman, A., Balkow, A., Glöde, A., Simon, K., Lidell, M. E., Betz, M. J., Enerbäck, S., Wess, J., Freichel, M., Blüher, M., König, G., Kostenis, E., Insel, P. A., & Pfeifer, A. (2016). The Gq signalling pathway inhibits brown and beige adipose tissue. *Nature Communications*, 7(1), 10895.
- Krott, L. M., Piscitelli, F., Heine, M., Borrino, S., Scheja, L., Silvestri, C., Heeren, J., & Di Marzo, V. (2016). Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. *Journal of Lipid Research*, 57(3), 464–473.
- Labbé, S. M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A. C., Lecomte, R., & Richard, D. (2015). In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB Journal*, 29(5), 2046–2058.
- Lanza, I. R., & Nair, K. S. (2009). Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods in Enzymology*, 457, 349–372.
- Latorre-Muro, P., O'Malley, K. E., Bennett, C. F., Perry, E. A., Balsa, E., Tavares, C. D. J., Jedrychowski, M., Gygi, S. P., & Puigserver, P. (2021). A cold-stress-inducible PERK/OGT axis controls TOM70-assisted mitochondrial protein import and cristae formation. *Cell Metabolism*, 33(3), 598-614.e7.
- Lebon, V., Dufour, S., Petersen, K. F., Ren, J., Jucker, B. M., Slezak, L. A., Cline, G. W., Rothman, D. L., & Shulman, G. I. (2001). Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(5), 733–737.
- Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metabolism*, 15(4), 480–491.
- Liu, S. Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S. M., Li, Y. C., Zhang, L.-Q., & Wu, Y. H. (2013a). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Scientific Reports*, 3, 2767.
- Liu, X., Wang, S., You, Y., Meng, M., Zheng, Z., Dong, M., Lin, J., Zhao, Q., Zhang, C., Yuan, X., Hu, T., Liu, L., Huang, Y., Zhang, L., Wang, D., Zhan, J., Jong Lee, H., Speakman, J. R., & Jin, W. (2015). Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology*, 156(7), 2461–2469.

- Liu, X., Zheng, Z., Zhu, X., Meng, M., Li, L., Shen, Y., Chi, Q., Wang, D., Zhang, Z., Li, C., Li, Y., Xue, Y., Speakman, J. R., & Jin, W. (2013b). Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell Research*, *23*(6), 851–854.
- Lubkowska, A., Dołęgowska, B., Szyguła, Z., Bryczkowska, I., Stańczyk-Dunaj, M., Sałata, D., Budkowska, M. (2013). *Winter-swimming as a building-up body resistance factor inducing adaptive changes in the oxidant / antioxidant status. October 2012*, 315–325.
- Ma, S. W., & Foster, D. O. (1986). Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *64*(5), 609–614.
- Mahdaviani, K., Chess, D., Wu, Y., Shirihai, O., & Arahamian, T. R. (2016). Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(1), 26–35.
- Markan, K. R., Naber, M. C., Ameka, M. K., Anderegg, M. D., Mangelsdorf, D. J., Kliwer, S. A., Mohammadi, M., & Potthoff, M. J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes*, *63*(12), 4057–4063.
- Matthias, A., Ohlson, K. B., Fredriksson, J. M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., & Cannon, B. (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), 25073–25081.
- Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M. C., Ruud, J., Nguyen, K. D., Theurich, S., Hausen, A. C., Schmitz, J., Brönneke, H. S., Estevez, E., Allen, T. L., Mesaros, A., Partridge, L., Febbraio, M. A., Chawla, A., Wunderlich, F. T., & Brüning, J. C. (2014). Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature Immunology*, *15*(5), 423–430.
- Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J., & Morishita, K. (2000). A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*, *96*(9), 3209–3214.
- Nakamura, K., & Morrison, S. F. (2011). *Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. 14*, 3641–3658.

- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803.
- Né Chad, M., Ruka, E., & Thibault, J. (1994). Production of nerve growth factor by brown fat in culture: relation with the in vivo developmental stage of the tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Physiology*, 107(2), 381–388.
- *Nedergaard, J., & Lindberg, O. (1982). The Brown Fat Cell. In *International Review of Cytology* (Vol. 74, Issue C).
- Nicholls, D. G. (1974). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance of the inner membrane. *European Journal of Biochemistry*, 49(3), 573–583.
- Nisoli, E., Tonello, C., Benarese, M., Liberini, P., & Carruba, M. O. (1996). Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology*, 137(2), 495–503.
- Nisoli, Enzo, Tonello, C., Briscini, L., & Carruba, M. O. (1997). Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Brown Adipocytes: Implications for Blood Flow to Brown Adipose Tissue. *Endocrinology*, 138(2), 676–682.
- *Oesper, P. (1964). The history of the Warburg apparatus: Some reminiscences on its use. *Journal of Chemical Education*, 41(6), 294.
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., & Kajimura, S. (2012). PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metabolism*, 15(3), 395–404.
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M. E., Oikonen, V., Noponen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerbäck, S., & Virtanen, K. A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metabolism*, 14(2), 272–279.
- Planavila, A, Redondo, I, Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L. A., Sitges, M., Giralt, M., van Bilsen, M., & Villarroya, F. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nature Communications*, 4, 2019.

- Planavila, Anna, Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research*, *106*(1), 19–31.
- Porter, C., Herndon, D. N., Chondronikola, M., Chao, T., Annamalai, P., Bhattarai, N., Saraf, M. K., Capek, K. D., Reidy, P. T., Daquinag, A. C., Kolonin, M. G., Rasmussen, B. B., Borsheim, E., Toliver-Kinsky, T., & Sidossis, L. S. (2016). Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metabolism*, *24*(2), 246–255.
- Prentice, R. L., Neuhouser, M. L., Tinker, L. F., Pettinger, M., Thomson, C. A., Mossavar-Rahmani, Y., Thomas, F., Qi, L., & Huang, Y. (2013). An exploratory study of respiratory quotient calibration and association with postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *22*(12), 2374–2383.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, *92*(6), 829–839.
- Reed, N., & Fain, J. N. (1968). Stimulation of respiration in brown fat cells by epinephrine, dibutyryl-3',5'-adenosine monophosphate, and m-chloro(carbonyl cyanide)phenylhydrazone. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(11), 2843–2848.
- Ricquier, D., Mory, G., Bouillaud, F., Combes-George, M., & Thibault, J. (1985). Factors controlling brown adipose tissue development. *Reproduction, Nutrition, Developpement*, *25*(1B), 175–181.
- Roberts, L. D., Ashmore, T., Kotwica, A. O., Murfitt, S. A., Fernandez, B. O., Feelisch, M., Murray, A. J., & Griffin, J. L. (2015). Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Diabetes*, *64*(2), 471–484.
- Rolfe, D. F., & Brand, M. D. (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *The American Journal of Physiology*, *271*(4 Pt 1), C1380-9.
- Rooyackers, O. E., Adey, D. B., Ades, P. A., & Nair, K. S. (1996). Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(26), 15364–15369.

- Röpke, M., Saura, P., Riepl, D., Pöverlein, M. C., & Kaila, V. R. I. (2020). Functional Water Wires Catalyze Long-Range Proton Pumping in the Mammalian Respiratory Complex I. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(52), 21758–21766.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, *15*(6), 659–667.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, *14*(3), 255–274.
- Sahoo, S. K., Shaikh, S. A., Sopariwala, D. H., Bal, N. C., & Periasamy, M. (2013). Sarcolipin Protein Interaction with Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺ATPase (SERCA) Is Distinct from Phospholamban Protein, and Only Sarcolipin Can Promote Uncoupling of the SERCA Pump. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(10), 6881–6889.
- Schneider-Picard, G., Carpentier, J. L., & Girardier, L. (1984). Quantitative evaluation of gap junctions in rat brown adipose tissue after cold acclimation. *The Journal of Membrane Biology*, *78*(2), 85–89.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, *454*(7207), 961–967.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., & Spiegelman, B. M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metabolism*, *6*(1), 38–54.
- Sepa-Kishi, D. M., Jani, S., Da Eira, D., & Ceddia, R. B. (2019). Cold acclimation enhances UCP1 content, lipolysis, and triacylglycerol resynthesis, but not mitochondrial uncoupling and fat oxidation, in rat white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *316*(3), C365–C376.
- Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., & Kajimura, S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS One*, *7*(11), e49452.
- Silva, J. E., & Larsen, P. R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, *305*(5936), 712–713.

- Silva, J. E., & Larsen, P. R. (1985). Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(6), 2296–2305.
- Smith, R. E. (1961). Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. *Physiologist*, 4, 113.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. In *Nature genetics* (Vol. 21, Issue 1, pp. 70–71).
- Spasić, M. B., Saičić, S., Buzadžić, B., Korać, B., Blagojević, D., & Petrović, V. M. (1993). Effect of long-term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(3), 291–299.
- Sun, K., Kusminski, C. M., Luby-Phelps, K., Spurgin, S. B., An, Y. A., Wang, Q. A., Holland, W. L., & Scherer, P. E. (2014). Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Molecular Metabolism*, 3(4), 474–483.
- Tan, P., Feng, Z., Zhang, L., Hou, T., & Li, Y. (2015). The mechanism of proton translocation in respiratory complex I from molecular dynamics. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(2), 170–179.
- Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A., & Hayaishi, O. (1997). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15789–15795.
- Thuzar, M., Law, W. P., Ratnasingam, J., Jang, C., Dimeski, G., & Ho, K. K. Y. (2018). Glucocorticoids suppress brown adipose tissue function in humans: A double-blind placebo-controlled study. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20(4), 840–848.
- Tibenska, V., Benesova, A., Vebr, P., Liptakova, A., Hejnová, L., Elsnicová, B., Drahota, Z., Hornikova, D., Galatík, F., Kolar, D., Vybiral, S., Alánová, P., Novotný, J., Kolar, F., Novakova, O., & Zurmanova, J. M. (2020). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β -adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of Applied Physiology*, 128(4), 1023–1032.

- Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., & Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(11), 4401–4406.
- Trayhurn, P., Ashwell, M., Jennings, G., Richard, D., & Stirling, D. M. (1987). Effect of warm or cold exposure on GDP binding and uncoupling protein in rat brown fat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *252*(2), E237–E243.
- Ukropec, J., Anunciado, R. P., Ravussin, Y., Hulver, M. W., & Kozak, L. P. (2006). UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1^{-/-} mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31894–31908.
- van der Lans, A. A. J. J., Hoeks, J., Brans, B., Vijgen, G. H. E. J., Visser, M. G. W., Vosselman, M. J., Hansen, J., Jörgensen, J. A., Wu, J., Mottaghy, F. M., Schrauwen, P., & van Marken Lichtenbelt, W. D. (2013). Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(8), 3395–3403.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1500–1508.
- Vegiopoulos, A., Müller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel Diaz, M., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Nüsing, R. M., Meyer, C. W., Wahli, W., Klingenspor, M., & Herzig, S. (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5982), 1158–1161.
- Virtue, S., Feldmann, H., Christian, M., Tan, C. Y., Masoodi, M., Dale, M., Lelliott, C., Burling, K., Campbell, M., Eguchi, N., Voshol, P., Sethi, J. K., Parker, M., Urade, Y., Griffin, J. L., Cannon, B., & Vidal-Puig, A. (2012). A New Role for Lipocalin Prostaglandin D Synthase in the Regulation of Brown Adipose Tissue Substrate Utilization. *Diabetes*, *61*(12), 3139 LP – 3147.

- Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D., & Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, *53*(4), 619–629.
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, *19*(10), 1338–1344.
- Whittle, A. J., Jiang, M., Peirce, V., Relat, J., Virtue, S., Ebinuma, H., Fukamachi, I., Yamaguchi, T., Takahashi, M., Murano, T., Tatsuno, I., Takeuchi, M., Nakaseko, C., Jin, W., Jin, Z., Campbell, M., Schneider, W. J., Vidal-Puig, A., & Bujo, H. (2015). Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose tissue and correlates with BMI in humans. *Nature Communications*, *6*(1), 8951.
- Wikström, M., & Springett, R. (2020). Thermodynamic efficiency, reversibility, and degree of coupling in energy conservation by the mitochondrial respiratory chain. *Communications Biology*, *3*, 451.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366–376.
- Xue, Y., Petrovic, N., Cao, R., Larsson, O., Lim, S., Chen, S., Feldmann, H. M., Liang, Z., Zhu, Z., Nedergaard, J., Cannon, B., & Cao, Y. (2009). Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metabolism*, *9*(1), 99–109.
- Yakes, F. M., & Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(2), 514 LP – 519.
- Yamashita, H., Sato, Y., Kizaki, T., Oh, S., Nagasawa, J., & Ohno, H. (1994). Basic fibroblast growth factor (bFGF) contributes to the enlargement of brown adipose tissue during cold acclimation. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *428*(3–4), 352–356.
- Yuan, X., Hu, T., Zhao, H., Huang, Y., Ye, R., Lin, J., Zhang, C., Zhang, H., Wei, G., Zhou, H., Dong, M., Zhao, J., Wang, H., Liu, Q., Lee, H. J., Jin, W., & Chen, Z.-J. (2016). Brown adipose tissue transplantation ameliorates polycystic ovary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(10), 2708–2713.

- Zhang, J., Nuebel, E., Wisidagama, D. R. R., Setoguchi, K., Hong, J. S., Van Horn, C. M., Imam, S. S., Vergnes, L., Malone, C. S., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2012). Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1068–1085.
- Zhao, J., Unelius, L., Bengtsson, T., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1994). Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 267(4), C969–C979.
- *Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*, 44(1), 3–15.
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221–225.
- Zhu, Z., Spicer, E. G., Gavini, C. K., Goudjo-Ako, A. J., Novak, C. M., & Shi, H. (2014). Enhanced sympathetic activity in mice with brown adipose tissue transplantation (transBATation). *Physiology & Behavior*, 125, 21–29.

Internetové zdroje

KOCHAR, A. The top 10 causes of death. *World Health Organization* [online]. WHO, 2020 [cit. 2021-8-10]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

18 Přílohy

Příloha 1

Izolační pufr (pH = 7,2)

250 mM Sacharosa (Mr = 342,296 g/mol, Sigma Aldrich)

10 mM Trizma Base (Mr = 121,140 g/mol, Sigma Aldrich)

0,5 g/l BSA fatty acid free (Sigma Aldrich)

Respirační médium (pH = 7,2)

10 mM Trizma Base (Mr = 121,140 g/mol, Sigma Aldrich)

80 mM KCl (Mr = 74,551 g/mol, Sigma Aldrich)

3 mM MgCl₂ (Mr = 95,211 g/mol, Sigma Aldrich)

5 mM KH₂PO₄ (Mr = 136,086 g/mol, Sigma Aldrich)

0,5 mM EDTA (Mr = 292,250 g/mol, Sigma Aldrich)