

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Anna Vávrová**

Mechanismy svalové netřesové termogeneze  
Mechanisms of muscle non-shivering thermogenesis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kristina Bardová, Ph.D.

Praha 2024

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat mé školitelce Mgr. Kristině Bardové, Ph.D. za odborné vedení, za vstřícný přístup, cenné rady a připomínky při vypracování bakalářské práce, za několikaletou podporu a možnost věnovat se výzkumu a za příležitosti, které mi poskytuje. Velké díky patří také celému Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR za přátelské prostředí, pomoc během celého studia a možnost být součástí jejich týmu. V neposlední řadě děkuji své mamince za ohromnou oporu, podporu a zázemí, které mi během studia vytváří a za její pomoc nejen během psaní bakalářské práce.

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

**Prohlášení:**

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

V Praze,

.....

Anna Vávrová

## **Abstrakt**

Schopnost regulace tělesné teploty je klíčová pro přežití a evoluci organismů. Endotermové mají efektivní mechanismy tvorby tepla, mezi které patří svalový třes a netřesová termogeneze (NST), ke které dochází převážně v hnědé tukové tkáni a svalu. Svalová NST je komplexní proces zahrnující více mechanismů, klíčovou roli však pravděpodobně hraje efekt sarkolipinu na protein SERCA, kdy dochází ke štěpení ATP bez přečerpání  $\text{Ca}^{2+}$  do sarkoendoplasmatického retikula doprovázené vznikem tepla. Další klíčové proteiny svalové NST jsou např. ryanodinové receptory, regulující vápníkové koncentrace, a fosfolamban, regulující aktivitu SERCA. Zásadní roli hraje také aktivita mitochondrií.

Schopnost svalové NST závisí na ontogenetickém stádiu organismu a na vnějších podmínkách, kterým je vystaven. Kromě tepelné homeostázy mají tyto mechanismy zásadní vliv také na regulaci celotělového metabolismu a mohou sloužit jako ochrana před obezitou indukovanou dietou.

Stejně jako jiné termogenní mechanismy i svalová NST je energeticky náročný proces a proto poznání jejích procesů a schopnost jejich regulace by mohlo přinést novou cestu v léčbě obezity a s ní souvisejících metabolických onemocnění.

**Klíčová slova:** netřesová termogeneze, sarkolipin, SERCA, sval, hnědá tuková tkáň

## **Abstract**

The capacity to regulate body temperature is of great importance for the survival and evolution of organisms. Endotherms possess highly efficient mechanisms for generating heat, including muscle shivering and non-shivering thermogenesis (NST), which occurs predominantly in brown adipose tissue and muscle. The process of muscle NST is a complex one, involving multiple mechanisms. However, it seems likely that the effect of sarcolipin on SERCA protein plays a key role. This occurs when ATP cleavage occurs without  $\text{Ca}^{2+}$  pumping into the sarcoendoplasmic reticulum, accompanied by heat generation. Other key proteins of the muscle NST include ryanodine receptors, which regulate calcium concentrations, and phospholamban, which regulates SERCA activity. Mitochondrial activity also plays a crucial role in this process.

The ability of muscle NST depends on the ontogenetic stage of the organism and the external conditions to which it is exposed. In addition to thermal homeostasis, these mechanisms also have a major impact on the regulation of whole-body metabolism and may serve as protection against diet-induced obesity.

As with other thermogenic mechanisms, muscle NST is an energy-intensive process. Consequently, an understanding of its processes and the ability to regulate them could provide a new avenue in the treatment of obesity and related metabolic diseases.

**Keywords:** nonshivering thermogenesis, sarcolipin, SERCA, muscle, brown adipose tissue

Seznam zkratek:

ACH	acetylcholin
AFP	proteiny zabraňující zamrzání (z angl. antifreeze protein)
ACHR	acetylcholinový receptor
AMK	aminokyselina
BAT	hnědá tuková tkáň (z angl. brown adipose tissue)
BMR	bazální metabolismus (z angl. basal metabolic rate)
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> kalmodulin-dependentní proteinová kináza II (z angl. Ca <sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase II)
DIO	dietou indukovaná obezita
DIT	dietou indukovaná termogeneze
FCCP	karbonyl kyanid-p-trifluormetoxyfenylhydrazin
HFD	vysokotučná dieta (z angl. high-fat diet)
LPL	lipoproteinová lipáza
MK	mastné kyseliny
MURF1	z angl. muscle RING-finger protein-1
NA	noradrenalin
NEAT	tvorba tepla, která není vázaná na pohybovou aktivitu (z angl. nonexercise activity thermogenesis)
NMJ	nervosvalová ploténka (z angl. neuro-muscular junction)
NPY	neuropeptid Y
NS	nervový systém
NST	netřesová termogeneze (z angl. non-shivering thermogenesis)
P/Q-VGCC	napětově regulovaný vápníkový kanál p/q typu (z angl. p /q type of voltage-gated calcium channel)

PKA	proteinkináza A
PGC1 $\alpha$	koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxizómů $\gamma$ 1- $\alpha$ (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator 1- $\alpha$ )
PLB	fosfolamban (z angl. phospholamban)
RYR	ryanodinový receptor
SER	sarkoendoplasmatické retikulum
SERCA	sarkoplazmatická/endoplazmatická retikulární Ca <sup>2+</sup> ATPáza
SLN	sarkolipin
SNS	sympatický nervový systém
T <sub>b</sub>	tělesná teplota
TMPD	N, N, N', N'-tetrametyl-p-fenylendiamin
TRPV1	z angl. transient receptor potential vanilloid1
UCP	odpřahující protein (z angl. uncoupling protein)
VDAC	napětově závislý aniontový kanál (z angl. voltage-dependent anion channel)
VMH	ventrální mediální hypotalamus

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Termogeneze .....	1
2.1	Ektotermie .....	1
2.2	Endotermie .....	2
2.3	Evoluce termogeneze .....	2
2.4	Mechanismy netřesové termogeneze .....	3
2.4.1	UCP1-závislá netřesová termogeneze v hnědé tukové tkáni .....	4
2.4.2	Další mechanismy netřesové termogeneze .....	5
3	Molekulární mechanismy svalové netřesové termogeneze.....	6
3.1	SERCA .....	9
3.2	Mechanismus svalové NST – regulace SERCA dependentních mechanismů .....	11
3.3	Mechanismus svalové NST – role mitochondrií .....	14
3.3.1	Měření mitochondriální respirace .....	16
3.4	Interakce netřesové termogeneze s lokomocí.....	18
3.5	Změna typů svalových vláken v souvislosti s adaptací k chladu .....	19
3.6	Důkazy NST na geneticky modifikovaných modelech .....	21
3.7	Interakce mezi mechanismy NST a dietou indukovanou obezitou .....	24
3.8	Superinhibovaný stav myosinu .....	25
4	Řízení svalové termogeneze .....	25
4.1	Řízení na úrovni hypotalamu .....	25
4.2	Orexin.....	27
4.3	Regulace pomocí SNS.....	29
4.3.1	Dopad sympatektomie na kosterní sval.....	29
4.3.2	MuRF1 .....	30
4.3.3	Adrenergní signalizace .....	30
4.4	Metody pro kvantifikaci sympatické inervace v tkáni .....	30

5	Závěr .....	32
6	Seznam literatury .....	33



## 1 Úvod

Schopnost termogeneze je klíčová pro život všech organismů. Zatímco u ektotermů dominuje termogeneze behaviorální, endotermové si vyvinuli celou řadu fyziologických mechanismů, jak udržení stálé teploty těla dosáhnout. Mezi tyto mechanismy patří svalový třes a netřesová termogeneze (NST) pomocí BAT. Nově se ukazuje, že by výrazným přispěvatelem k termogenezi mohla být i NST ve svalu, o jejíž existenci u savců, konkrétně vačnatců a ptakořitných, se uvažuje od roku 1992 (Nicol et al., 1992) cit. dle (Nowack, Giroud et al. 2017). Mechanismus, jak k tomuto typu termogeneze dochází, tedy vliv sarkolipinu (SLN) na sarkoplazmatickou/endoplazmatickou retikulární  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázu (SERCA), byl však rozklíčován až v posledních letech (Bal, Maurya et al. 2012, Bal, Maurya et al. 2016).

Je však možné, že svalová NST je komplexnější a že molekulárních mechanismů, které se při tom podílejí na vzniku tepla je více. Také její regulace a faktory, které ji ovlivňují, zůstávají ne zcela prozkoumané. Mezi fakta, která by mohla hrát důležitou roli v posunu v pochopení těchto mechanismů, spadá i detailnější popis isoform SERCA a jejich regulací pomocí dalších proteinů, nebo závislost exprese různých typů svalových vláken (respektive MHCI a MHCII) a exprese proteinů klíčových pro svalovou NST.

O pochopení termogenních mechanismů je velký zájem. Termogenní mechanismy hrají důležitou roli v energetické homeostáze, jsou velmi energeticky náročné, a proto by pochopení a farmakologické ovlivnění těchto procesů mohlo hrát klíčovou roli v boji proti celosvětové epidemii obezity. Pokud by se tedy ukázalo, že svalová NST má významnou termogenní a energetickou roli i u člověka, pochopením jejich mechanismů a regulace a potenciálně schopností její aktivace by se otevřel další přístup jak s obezitou bojovat.

## 2 Termogeneze

### 2.1 Ektotermie

Ektotermní organismy k manipulaci s tělesnou teplotou ( $T_b$ ) využívají behaviorální termoregulaci. Rychlost jejich metabolismu je závislá na okolní teplotě. Pokud jejich teplota klesne pod prahovou hodnotu, přecházejí do stavu hibernace, kdy je jejich metabolismus velmi zpomalen, tento stav trvá do doby, kdy nastanou příznivější podmínky prostředí. Aby předešly poškození vnitřního prostředí těla, snižují teplotu tání tělních tekutin pomocí speciálních proteinů (AFPs, z angl. antifreeze proteins), nebo zabraňují zamrznutí intracelulárních tekutin

anebo vzniku ledových krystalů v extracelulárním prostoru pomocí jiných kryoprotektantů, jako je glycerol (Costanzo and Lee Jr. 1993).

## 2.2 Endotermie

Na rozdíl od ektotermů, musí mít endotermové vyvinuté takové mechanismy, aby za co nejmenších energetických nákladů dokázali udržet stálou tělní teplotu v teplotně nestálém prostředí. Kromě produkce tepla přirozeně vznikající při tělesném metabolismu (např. v játrech), má tělo i další účinné mechanismy termogeneze. Mezi ně patří svalový třes a NST pomocí hnědé tukové tkáně (**BAT**, z angl. brown adipose tissue) a svalů, dále také vápníkové cyklování, na kreatinu závislé cyklování ADP/ATP, případně endogenní mitochondriální odprážení (Brownstein, Veliova et al. 2022).

## 2.3 Evoluce termogeneze

Různé organismy mají různé mechanismy, jak se vyrovnat s nepříznivými vnějšími podmínkami. Jeden z faktorů, kterému musí čelit, jsou výkyvy okolní teploty. Udržování stálé tělní teploty, a tedy i správná regulace termogenních mechanismů, jsou klíčové pro přežití mnoha organismů (termoregulátoři), jiní však dokáží přežít v širokém rozmezí vnějších teplot bez nutnosti regulace (termokonformeři). Za účelem regulace tělní teploty se proto během evoluce vyvinulo několik způsobů, jak toho organismy dosahují. Částečná endotermie pravděpodobně vznikla jako první u plazů, kteří využívají jak behaviorální, tak fyziologické mechanismy termoregulace. U plazů je pro vznik endotermie klíčová dostatečná velikost, poprvé se u nich objevila také třesová termogeneze a to konkrétně u kraitů, které takto zahřívají vajíčka v hnízdě (Grigg, Beard et al. 2004). Dalším důležitým stupněm v evoluci endotermie je tzv. protoendotermie, pro jejíž výzkum slouží jako modelové mechanismy echidny, které i přes to, že vykazují heterotermii (kolísání  $T_b$  během dne a ročních období), mají mechanismy charakteristické pro obligátní endotermii, jako jsou vyšší klidový metabolismus (v porovnání s plazy), třesová termogeneze, lokomotorická aktivita vedoucí ke zvýšení teploty, a také jejich schopnost být aktivní i za velmi nízké  $T_b$ . Mezi obligátní endotermie patří savci a ptáci. Pro vznik endotermie je klíčový především vznik endogenních termogenních mechanismů (svalová třesová a netřesová termogeneze, vznik BAT) a dostatečná tepelná izolace, a to jak přítomností srsti nebo peří, tak možností regulace průtoku krve v periferiích (Grigg, Beard et al. 2004).

Jedním z mechanismů adaptivní termogeneze savců a ptáků je třes, který je však možný využívat pouze na krátkou dobu, je velmi energeticky náročný a může omezovat lokomoční funkci svalů (Rowland, Bal et al. 2014). Proto může organismus používat ještě mechanismy

NST (Chaffee and Roberts 1971). Mezi mechanismy NST u savců patří NST pomocí odpráhujičícího proteinu 1 (**UCP1**; z angl. uncoupling protein 1) v BAT a NST ve svalu. BAT je velice efektivní zdroj tepla, její zastoupení v rámci celého těla je však u velkých savců, jako jsou lidé, relativně malé a je lokalizována především do středu těla (mezilopatková oblast), a musí být tedy zajištěn dostatečný rozvod tepla, vznikajícího v BAT, do celého těla. Tento mechanismus tvorby tepla využívají především savci v neonatálním stádiu vývoje a malí hlodavci, zatímco u velkých dospělých savců bývá buď značně omezen a nebo úplně chybí. Zdá se, že je pro ně důležitá svalová NST, i když se názory v této oblasti liší a někteří se domnívají, že svalová NST vůbec nemusí existovat (Golozoubova, Hohtola et al. 2001). Oproti termogenezi v BAT může být svalová NST méně účinná, avšak svaly zabírají velkou část objemu těla, produkce tepla je tedy ve výsledku velká a je rozprostřena po celém těle. I přesto, že primárním mechanismem NST u hlodavců je pravděpodobně funkce UCP1 v BAT, i u nich hrají v termoregulaci klíčovou roli další mechanismy, jako je např. pravděpodobně SLN zprostředkovaná termogeneze v kosterním svalu (Pant, Bal et al. 2015; Rowland, Bal et al. 2015). Jako důkaz, že existují i jiné mechanismy NST než v BAT, byly pro výzkum kromě velkých savců použity myši UCP1-KO modely.

U vačnatců, ptáků a velkých placentálů, kteří postrádají mechanismus NST pomocí UCP1 v BAT, je sval pravděpodobně hlavním místem termogeneze (Bicudo, Vianna et al. 2001; Rowland, Bal et al. 2014). K podobnému jevu dochází i u myši, u kterých není funkční NST v BAT (Bal, Maurya et al. 2012; Rowland, Bal et al. 2015).

#### 2.4 Mechanismy netřesové termogeneze

Vývoj NST byl klíčový pro radiaci savců do prostředí s chladnějším podnebím (Nowack, Giroud et al. 2017). Svalový třes není dostačující jako dlouhodobý zdroj tepla nejen pro jeho vysoké energetické náklady, ale také proto, že jedince může omezovat v lokomoci, což je klíčové pro přežití, např. pro útek před predátorem a shánění potravy (Rowland, Bal et al. 2014). Existují však i důkazy o tom, že mechanismy svalové třesové a netřesové termogeneze fungují nezávisle na sobě a navzájem se nevyklučují. Výzkum na myších, u kterých byla pozorována svalová NST i přes blokaci svalového třesu, ukazuje, že je možné, že oba mechanismy svalové termogeneze mohou probíhat nezávisle na sobě (Bal, Maurya et al. 2012). Je však zřejmé, že pak, především u malých zvířat, může nastat problém v koordinaci svalové NST a řízení lokomoce, což může být jedním z důvodů ke vzniku NST v BAT u těchto druhů (Nowack, Giroud et al. 2017).

Obecně existuje více mechanismů NST, mezi hlavní dva patří: NST zprostředkovaná UCP1 v BAT a svalová NST, pro níž je klíčová odpráhuující funkce SLN na SERCA; podílejí se na ní však i další mechanismy (viz kapitola 3). Oba mechanismy NST jsou založeny na prázdném cyklování iontů, čímž dochází ke vzniku tepla.

#### 2.4.1 UCP1-závislá netřesová termogeneze v hnědé tukové tkáni

Tvorba tepla pomocí UCP1 umožňuje rychlejší zahřátí bez omezení svalové lokomoční funkce (Rowland, Bal et al. 2014). Mezi diskutované teorie důvodu vzniku BAT patří: a) kolonizace chladnějšího prostředí (Nowack, Giroud et al. 2017), b) ochrana před chladovým stresem v časné postnatálním období (Cannon and Nedergaard 2004), c) udržení vysoké  $T_b$  rodičů během péče o potomky (Oelkrug, Goetze et al. 2013), d) neslučitelnost mechanismů třesové a netřesové termogeneze v kosterním svalu, jak bude diskutováno dále, viz kapitola 3.4 (Rowland, Bal et al. 2014), e) rychlé probuzení z torporu a snížení energetických nákladů na získání ideální  $T_b$  při probouzení (Oelkrug, Heldmaier et al. 2011; Nowack, Giroud et al. 2017).

Klíčovou roli má BAT u savčích mláďat, která jsou náchylná k hypotermii, protože nedokáží dostatečně využívat behaviorální mechanismy termoregulace, nemají dostatečně vyvinuté svaly pro třes a mají vysoký obsah vody v těle. Také lidské novorozenci mají dostatečně vyvinutou BAT, k jejíž redukci dochází v průběhu ontogeneze (Nowack, Giroud et al. 2017).

Závislost zvýšení  $T_b$  za účelem péče o potomky, závislé na BAT, byla zpochybněna nálezem *Salvator merianae*, plazů, kteří i přes nepřítomnost BAT zvyšují svou  $T_b$  během reprodukčního období (Tattersall, Leite et al. 2016), cit. dle (Nowack, Giroud et al. 2017). Předpokládá se, že za tímto jevem může stát podobný mechanismus jako NST zprostředkovaná pomocí SERCA (Nowack, Giroud et al. 2017).

NST pomocí BAT je dále klíčová pro regulaci probouzení během hibernace, ke které dochází spíše u malých savců. NST v BAT umožňuje rychlejší zahřátí a tím rychlejší probuzení, snižují se tak energetické náklady na probuzení z hibernace (Oelkrug, Heldmaier et al. 2011). Během hibernace dochází k poklesu exprese SLN (Oliver, Anderson et al. 2019), čímž dochází k redukci energetických ztrát a podporuje to myšlenku, že BAT hraje klíčovou roli pro probuzení. U jedinců bez funkční NST v BAT dochází k energeticky náročnějšímu a pomalejšímu probouzení, ale i u nich jsou zbylé termogenní mechanismy k probouzení dostačující. To je důvod, proč se vačnatci z tohoto stavu probouzejí pomaleji a proč jejich teplota neklesá během hibernace tak nízko, jak je tomu u placentálů (Nowack, Giroud et al. 2017).

Mechanismy NST jsou obecně klíčové pro malé savce, žijící v teplotně nestálém prostředí. I přesto, že primární zdroj tepla je pro ně NST v BAT, mají vyvinutou i svalovou NST. Kombinací obou mechanismů dokáží zajistit udržení optimální teploty za co nejmenších energetických výdajů. Jedním z omezujících faktorů svalové NST u malých savců je vysoký podíl glykolytických svalových vláken, která nejsou schopna efektivní svalové NST (viz kapitola 3.5) (Nowack, Giroud et al. 2017).

#### 2.4.2 Další mechanismy netřesové termogeneze

Mezi další důležité orgány, ve kterých je vytvářeno teplo, patří kosterní svaly. Ve svalech pak dochází k tvorbě tepla jednak pomocí svalového třesu, a jednak pomocí svalové NST. Je popsáno více typů svalové NST, často u zvířat, která nemají funkční UCP1-závislou termogenezi. Tito živočichové postrádají BAT, a tedy i jedno z klíčových míst NST. Patří mezi ně například vačnatci, kteří však žijí v prostředí, kde nejsou vystavováni velkému chladovému stresu, proto pro ně nároky na tvorbu tepla nejsou tak vysoké. BAT je také redukována u velkých savců, kteří mají vysoký podíl objem/povrch, což vede k menším tepelným ztrátám do okolí. I tyto organismy však musejí produkovat teplo v reakci na teplotní výkyvy prostředí, jedním z předpokládaných mechanismů je využití svalové NST (Nowack, Giroud et al. 2017).

Někteří velcí savci, např. prasata, v evoluci ztratili funkční UCP1 úplně, generovat teplo prostřednictvím BAT tedy nejsou schopni ani mláďata. Ke ztrátě UCP1 došlo pravděpodobně proto, že prasata osídlila studenější oblasti až sekundárně. Původní výskyt prasat byl v tropických oblastech, kde BAT nebyla tolik potřebná. Kromě toho mají prasata dobrou behaviorální termoregulaci a jejich tělesná stavba (vysoký poměr objem/povrch) napomáhá k udržení tepla (snižuje teplotní ztráty). I přesto však prasata osídlila i chladné oblasti, potřebují tedy mechanismy termogeneze, které jim umožňují reagovat na výkyvy teplot prostředí. Hlavním místem termogeneze je u nich tedy pravděpodobně kosterní sval a primárním zdrojem tepla by pak byla NST pomocí SLN a SERCA1a (Nowack, Vetter et al. 2019), dále také třes nebo jiné teoreticky navrhované mechanismy svalové termogeneze (UCP3, SERCA2b) (Ikeda, Kang et al. 2017; Lin, Cao et al. 2017) cit. dle (Nowack, Vetter et al. 2019).

Kromě savců dokáží svou vnitřní teplotu regulovat (vykazují alespoň částečnou endotermii) i další živočichové, jako např. ptáci, nebo hlubokomořské ryby. Ptáci se spoléhají pouze na svalovou termogenezi a to jak na třes, tak na NST. Mechanismus vzniku tepla pomocí NST je u nich však částečně odlišný od savců. Ptáci se nespoléhají na odpřahující funkci SLN (Montigny et al., 2014), k cyklování  $Ca^{2+}$  u nich dochází díky více propustné isoformě RyR1

a chladem indukovanému zvýšení množství SERCA1 (rychlejší isoforma) (Dumonteil, Barré et al. 1995), cit. dle (Nowack, Giroud et al. 2017). Ptáci také exprimují specifickou isoformu UCP ve svalu, jejíž exprese je indukována chladem (Raimbault, Dridi et al. 2001), cit. dle (Nowack, Giroud et al. 2017). Jejich svaly vykazují vysoký metabolismus a na rozdíl od savců spoléhají pouze na metabolismus mastných kyselin (**MK**; oxidativní metabolismus). K udržení jejich endotermie přispívá do jisté míry i vysoká izolační schopnost peří. Absence BAT může být také důvodem toho, že ptáci nehibernují (Nowack, Giroud et al. 2017).

Dalšími organismy vykazující alespoň částečnou (kraniální) endotermii a postrádající BAT jsou některé hlubokomořské ryby, které však mají tzv. specializovaný orgán pro tvorbu tepla (anglicky „heater organ“) odvozený od extraokulárních svalů. Tento orgán postrádá kontraktilní funkci, umožňuje však tvorbu tepla díky prázdným cyklům  $\text{Ca}^{2+}$  (Bardova, Janovska et al. 2024). K cyklování  $\text{Ca}^{2+}$  v tomto případě dochází posílením exprese SERCA1a a propustnosti ryanodinových receptorů (**RyR**). Pro tento orgán je typické velké sarkoendoplasmatické retikulum (**SER**) s vysokou expresí proteinů umožňujících cyklování  $\text{Ca}^{2+}$ , dále obsahuje velké množství mitochondrií a je chudý na kontraktilní proteiny (Block, O'Brien et al. 1994). Kromě zahřívání je pro ryby tento orgán důležitý pro zlepšení orientace v hloubce (zahřátí oblasti v okolí očí) a tedy ke zlepšení schopnosti lovu (Fritsches, Brill et al. 2005; Nowack, Giroud et al. 2017).

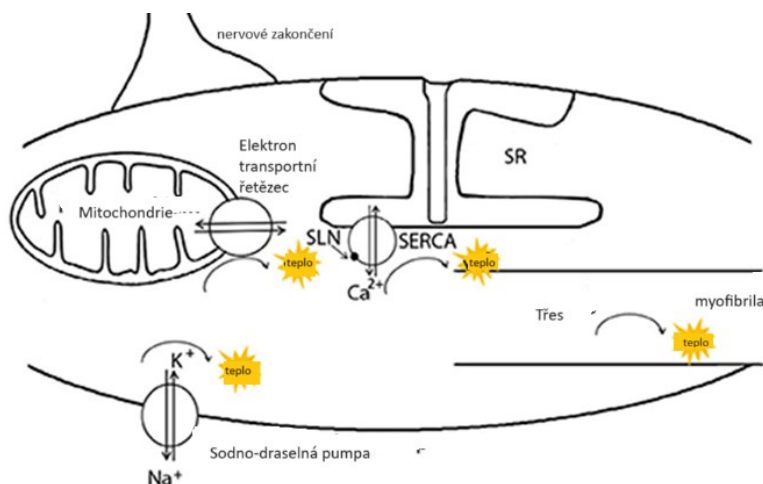
Souhrnem se dá říci, že pro vývoj savčí endotermie byl klíčový vznik NST pomocí BAT. Existence endotermních savců postrádajících BAT však ukazuje na důležitost dalších mechanismů pro tvorbu tepla, zejména svalového třesu a svalové NST. Mezi endotermny patří také ptáci, kteří se spoléhají pouze na svalovou termogenezi a pro NST využívají jiné mechanismy než savci. Částečnou endotermii založenou na vzniku tepla podobnému savčí svalové NST pak vykazují i některé ryby.

### 3 Molekulární mechanismy svalové netřesové termogeneze

Ke vzniku tepla v kosterním svalu dochází pomocí několika mechanismů, mezi které patří svalový třes, mechanismy spojené s prázdným cyklováním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (tzv. futile cycling), které zahrnuje uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  ze SER pomocí RyR a odpřahující funkce SLN na SERCA vedoucí k její ATPázové aktivitě bez vykonání práce a další mechanismy např. změny na úrovni mitochondriálního metabolismu.

Teplo v kosterním svalu vzniká během všech chemických procesů, ty důležité pro tuto práci jsou zobrazeny na obr. 1. Jelikož vždy dochází k únikům některých protonů přes vnitřní





Obr. 1: **Mechanismy NST ve svalů**, převzato a upraveno podle (Nowack, Giroud et al. 2017); SLN (sarkolipin), SERCA (sarkoplazmatická/endoplazmatická retikulární  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza), SR (sarkoplazmatické retikulum).

mitochondriální membránu, je i samotný proces syntézy ATP provázen tvorbou tepla (Rolfe and Brown 1997; Clarke, Catauro et al. 2013). Vznik tepla je také nevyhnutelný během hydrolyzy ATP sodíkovo-draslíkovou pumpou, myosin-ATPázou a během fungování již zmíněné SERCA (mechanismus je popsán níže). SERCA tedy produkuje teplo jak již zmíněným mechanismem skluzu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, tak i během svalového stahu, včetně svalového třesu. Dalším zdrojem tepla svalové NST je i relativní navýšení mitochondriální oxidativní fosforylace a v důsledku pak i únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, k té opět přispívá mimo jiné i aktivita SERCA svými nároky na ATP. Aktivitou SERCA dochází k štěpení ATP na ADP. Následná fosforylace ADP mitochondriemi vede ke zvýšení spotřeby kyslíku (de Meis 2001). Mechanismy tvorby tepla mohou nastupovat v různém časovém horizontu po vystavení chladu a v závislosti na organismu (živočišném druhu). V některých pracích se uvádí, že aktivace NST pomocí SERCA by mohla být okamžitá (Bal, Maurya et al. 2012; Nowack, Giroud et al. 2017).

Proteiny, které se účastní i prvního ze zmíněných mechanismů svalové NST, jsou klíčové pro regulaci správné  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace a důležité pro svalovou kontrakci. Po depolarizaci sarkolemy dochází k otevření RyR na SER, přes které dochází k uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  do sarkoplazmy, to vede v konečném důsledku ke svalovému stahu. Pro svalovou relaxaci je pak důležité odčerpání  $\text{Ca}^{2+}$  zpět do SER. K tomu slouží protein SERCA. Tyto a další mechanismy regulace koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů jsou využívány i ve svalové NST, mezi něž patří i cyklování  $\text{Ca}^{2+}$ . Také k tomuto procesu přispívají mj. proteiny RyR a SERCA. Navrhovaným mechanismem spuštění svalové NST je zvýšení cytoplasmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . V tom hraje významnou roli SLN a jeho odpráhující funkce na SERCA, kdy odpojuje hydrolyzu ATP od transportu  $\text{Ca}^{2+}$ , nedochází tedy

k přečerpávání  $\text{Ca}^{2+}$  do SER, ale k tomu, že  $\text{Ca}^{2+}$  zůstává v cytoplazmě, dále vstup  $\text{Ca}^{2+}$  přes  $\text{Ca}^{2+}$  kanály a RyR. Těmito mechanismy se zvyšuje cytosolická koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , dochází k aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulin-dependentní proteinové kinázy II (CAMKII) dráhy vedoucí k fosforylaci RyR1, které ve fosforylované formě propouštějí více  $\text{Ca}^{2+}$  ze SER do cytosolu v porovnání s formou nefosforylovanou. Všechny tyto procesy vedou k prázdným cyklům  $\text{Ca}^{2+}$ , které výrazně přispívají ke svalové NST (Bal, Maurya et al. 2016).

Hlavní roli v popisovaném mechanismu prázdného cyklování je SLN regulovaná aktivita SERCA. Ukázalo se, že tento mechanismus je klíčový pro udržení  $T_b$  u myší, které nemají možnost tvořit teplo v BAT (Bal, Maurya et al. 2012). Hlavním regulátorem tohoto procesu je SLN, který po navázání na SERCA způsobuje odpřažení přenosu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pomocí SERCA od hydrolyzy ATP (uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  zpět do cytosolu namísto projití membránou do SER) a tedy uvolnění energie z hydrolyzy ATP v podobě tepla, aniž by SERCA pumpovala ionty. Díky prázdnému cyklování, aktivovanému SLN, dochází k posílení hydrolyzy, neboť ionty přeneseny nejsou a stoupá tedy rozdíl v koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$  mezi lumen SR a cytolem. Vzrůstá tedy cytosolická koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , což je důležitý regulátor svalového metabolismu a aktivity mitochondrií (Sahoo, Shaikh et al. 2013).

Zvýšená interakce SLN/SERCA tedy podporuje odpojení aktivity SERCA, která po tomto spojení nefunguje metabolicky efektivně, což vede k tomu, že část energie získané hydrolyzou ATP je uvolňováno ve formě tepla. Spojení ale zároveň vytváří zvýšenou poptávku po energii. Zvýšením energetické náročnosti dochází k remodelaci mitochondrií, jejich struktury a krist, ke zvětšení velikosti mitochondrií, ke zvýšení exprese proteinů pro komplexy oxidativní fosforylace, dále také ke zvýšení SER-mitochondriálních kontaktů, vedoucí ke zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  přílivu do mitochondrií, což vede ke zvýšení produkce ATP (viz níže). Kromě toho, vazba SLN na SERCA má za následek zvýšenou lokální cytosolickou koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , což představuje signál pro  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní dráhy, včetně CAMKII, o kterých je známo, že hyperfosforylují RyR. Fosforylovaný RyR1 vede ke spontánnímu úniku  $\text{Ca}^{2+}$  ze SER, což opět vede k posílení aktivity SERCA, hydrolyze ATP a produkci tepla (Bal, Maurya et al. 2016).

Termogeneze myšího svalu může být indukována i hyperosmolaritou. Inhibicí  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  kotransportu bumetamidem nebo odstraněním  $\text{Cl}^-$  z extracelulárního prostoru dochází ke snížení bazálního metabolismu potkaního svalu (m. soleus), stejně jako ke snížení energetického výdeje závislého na  $\text{Ca}^{2+}$ . Bumetamid nebo snížení extracelulárního  $\text{Cl}^-$  zabránilo



výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  stimulovanému hyperosmolaritou. Po inhibici uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplasmy dantrolenem došlo ke zvýšenému influxu  $\text{Na}^+$  do svalu v normosmolaritě (Chinet 1993).

Souhrnem je možno říci, že teplo ve svalu může nezávisle na třesu vznikat mnoha mechanismy, klíčovým je však NST zprostředkovaná interakcí SLN-SERCA. Důležitou úlohu v těchto mechanismech mají mitochondrie, které zprostředkovávají dostatečný přísun ATP pro tyto reakce a jejich aktivita také přispívá ke vzniku tepla. Nitrobuněčná signalizace je závislá na  $\text{Ca}^{2+}$ , jehož vzestup vede k aktivaci mechanismů svalové NST a funkce mitochondrií.

### 3.1 SERCA

SERCA je transmembránový protein lokalizovaný v membráně SER, patří do rodiny P-ATPáz a tvoří dimer o molekulové hmotnosti 110 kDa. Jeho hlavní funkcí je transport  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplasmy do SER, je to tedy důležitý protein jak pro regulaci buněčné signalizace, tak pro kontraktilní funkci svalu, kdy je nezbytné odčerpávat  $\text{Ca}^{2+}$  zpět do SER, aby nedocházelo ke svalovým křečím a byla umožněna správná funkce myosinu a aktinu. Transport  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí SERCA je poháněn hydrolýzou ATP. Fosfát z ATP je přenášen na aspartátový zbytek katalytické domény, čímž dochází k reverzibilní konformační změně umožňující přenos iontů. Energie z hydrolýzy 1 ATP je dostatečná pro přenos 2 iontů  $\text{Ca}^{2+}$  (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). Transportní funkci SERCA regulují dva hlavní proteiny – SLN a fosfalamban (**PLB**). Mezi další faktory mající vliv na aktivitu SERCA patří protein myoregulin, koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě i v SR, hladiny ATP, ADP a anorganického fosfátu, pH, afinita k  $\text{Ca}^{2+}$ , rychlost fosforylace a vazby, případně i fluidita membrány (Bal and Periasamy 2020).

Protein SERCA je evolučně funkčně i strukturně konzervován a můžeme ho najít napříč druhy. I přesto, že u bezobratlých je kódován pouze jedním genem, pomocí alternativního sestřihu u nich vznikají 2 isoformy vykazující vysokou podobnost se savčími isoformami SERCA2a a SERCA2b (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). U savců je SERCA kódována 3 geny SERCA 1, SERCA 2, SERCA 3, pomocí alternativního sestřihu pak vzniká více než 10 isoform. V rychlých kosterních svalech je typicky exprimován gen SERCA1, alternativním sestřihem z něj vznikají dvě isoformy SERCA1a (994 aminokyselin (**AMK**)) a SERCA1b (1011AMK). SERCA1a v průběhu dospívání nahrazuje SERCA1b, charakteristickou pro plod. SERCA2 kóduje isoformy SERCA2a (997AMK) a SERCA2b (1042AMK). Isoforma SERCA2a v dospělosti tvoří dominantní isoformu v srdci a pomalém svalu, kde se její exprese zvyšuje v průběhu dospívání, v rychlém svalu se exprimuje pouze ve stádiu plodu. SERCA2b se nachází v nízkých hladinách ve všech tkáních. V srdci se nachází i isoforma SERCA2c

(999AMK). SERCA 3 je exprimována především v nesvalových tkáních (hlavně v hematopoetických buněčných liniích, krevních destičkách, epiteliálních buňkách, fibroblastech a endoteliálních buňkách), u člověka dochází k alternativnímu sestřihu do šesti isoform mRNA. Jako translatované isoformy byly však detekovány jen SERCA3a, SERCA3b, SERCA3c (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). Je tedy patrné, že různé isoformy SERCA hrají různou roli. Pro expresi isoform SERCA a zrání svalů je klíčová svalová inervace, protože denervace kosterních svalů vede k poklesu exprese SERCA2a, což značí návrat k fetálnímu fenotypu (Schulte, Peters et al. 1994). Expresie různých isoform SERCA nezávisí pouze na typu tkáně, ale důležité je také stádium vývoje. Během vývoje dochází ke změnám v expresi různých isoform vedoucí k fenotypovým změnám a k ovlivnění zrání svalů (viz tab. 1). Poměr motorických jednotek a jejich aktivita může mít vliv na typ svalového vlákna a je zodpovědná za heterogenitu svalu, což opět odkazuje na důležitost vývoje inervace svalu během zrání (Periasamy and Kalyanasundaram 2007).

Obecně mají SERCA1 isoformy rychlou kinetiku a SERCA2 isoformy pomalou kinetiku (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). Pant 2015 (Pant, Bal et al. 2015) tvrdí, že v rychlých kosterních svalech dochází během postnatálního vývoje ke změnám exprese SERCA od pomalé SERCA2a k rychlé SERCA1a. Nezmiňuje se však o isoformě SERCA1b, která je dle Periasamy a kol. (Periasamy and Kalyanasundaram 2007) exprimována v rychlých svalech v neonatálním stádiu.

Isoforma SERCA	Kosterní sval				Srdeční sval		Hladký sval	Nesvalové buňky
	Rychlá vlákna		Pomalá vlákna		plod	dospělec		
	plod	dospělec	plod	dospělec				
<b>SERCA 1a</b>	-	+++++	-	-	-	-	-	-
<b>SERCA 1b</b>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<b>SERCA 2a</b>	+	-	+	+++	+	++++	+	-
<b>SERCA 2b</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SERCA 3a</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>SERCA 3b</b>	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>SERCA 3c</b>	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabulka 1: **Expresie isoform SERCA v závislosti na stádiu vývoje a typu tkáně**, převzato a upraveno podle (Periasamy and Kalyanasundaram 2007).

Během embryonálního vývoje dochází v srdci také k výraznému vývoji SER, které ve zralém kardiomyocytu tvoří rozsáhlou síť. Rozvoj SER koreluje se zvýšením exprese SERCA2. SERCA2a je však ve svalu detekována již v raných embryonálních stádiích. V těchto stádiích dochází i k expresi SERCA3, která se postupně snižuje. SERCA2b se v srdci exprimuje vždy, tak jako ve všech tkáních těla. U senescentních srdcí potkanů i lidí dochází ke snížení exprese SERCA, také dochází k úbytku fosforylovaného PLB, tím je ohrožena  $\beta$ -adrenergní signalizace a dochází ke zpomalení kontraktility (Periasamy and Kalyanasundaram 2007).

Na zastoupení isoform SERCA ve svalu má vliv také chladová adaptace, která vede k posunu exprese isoform SERCA směrem od rychlých k pomalým snížením exprese rychlé isoformy SERCA1a a zvýšením exprese SERCA2a (Bal, Maurya et al. 2016). Svalová NST probíhá převážně v pomalých oxidativních vláknech, jejichž větší zastoupení u větších savců koreluje s nižší schopností NST v BAT (Rowland, Bal et al. 2014). Složení svalových vláken u myši však může korelovat s požadavky organismu na termogenezi a odpovídá tedy na aklimatizaci myši. Pant a kol. ukázali, že po chladové aklimatizaci došlo k nárůstu SERCA2a, která je typická pro pomalá svalová vlákna (Pant, Bal et al. 2015; Nowack, Giroud et al. 2017).

Souhrnem se dá říci, že za svalovou NST stojí především proteiny SERCA, SLN a RyR, umožňující prázdné cyklování  $\text{Ca}^{2+}$  a hydrolyzu ATP bez vykonané práce, což vede ke vzniku tepla. Existuje více isoform SERCA s různými vlastnostmi. Jejich exprese se liší v závislosti na tkáni, vývojovém stádiu a vnějších podmínkách. Kromě SLN zprostředkované svalové NST k tvorbě tepla přispívají i další mechanismy, jako je např. aktivita mitochondrií.

### 3.2 Mechanismus svalové NST – regulace SERCA dependentních mechanismů

Transportní funkce SERCA je regulována dvěma hlavními proteiny SLN a PLB. SLN se váže na SERCA současně s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, jeho vazba vede k odprášení hydrolyzy ATP od přenosu iontů  $\text{Ca}^{2+}$  přes membránu. Naproti tomu PLB se váže pouze na SERCA nevážící  $\text{Ca}^{2+}$  a jeho regulační funkce spočívá v ovlivnění afinity SERCA k  $\text{Ca}^{2+}$  iontům. Fosforylovaný PLB zvyšuje afinitu SERCA, což má za následek zvýšení kontraktility. Nefosforylovaný PLB naopak afinitu snižuje. Skrze PLB je tedy umožněna reakce na  $\beta$ -adrenergní stimulaci (fosforylace PLB přes proteinkinázu A (PKA)) v srdci (Bhupathy, Babu et al. 2007).

PLB a SLN mají homologní sekvence, kterými interagují se SERCA. U PLB se místo interakce nachází na N30C, k tomu je homologní E7C SLN. Je však zajímavé, že i po mutaci E7C SLN, místa interakce SLN a SERCA, se SLN na SERCA za vysokých koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě dokáže vázat. Naproti tomu mutované N30C PLB vede k zániku interakce PLB-SERCA (Bal,

Maurya et al. 2012). Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012) ukázali, že SLN se váže na SERCA1a při nízkých i vysokých cytoplasmatických koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$ , naproti tomu PLB se váže na SERCA1a jen při nízkých koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$  (do  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ). Vzhledem k tomu, že v textu není specifikováno, zda je PLB fosforylovaný, je tedy možné, že detekovali nefosforylovaný PLB, který snižuje afinitu SERCA k  $\text{Ca}^{2+}$ , což by při nízkých cytoplasmatických koncentracích bylo pravděpodobné. Zajímavá by byla i detekce fosforylovaného PLB, je možné, že by se mohl na SERCA vázat naopak ve vyšších cytoplasmatických koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$ . Je i možné, že SLN a  $\text{Ca}^{2+}$  se mohou na SERCA vázat najednou, což podporuje tvrzení o odpráhující funkci SLN transportu od hydrolyzy a produkci tepla (Bal, Maurya et al. 2012). O významu odpráhující funkce SLN a jeho termogenní funkci vypovídají i vyšší hladiny SLN u myši s ablatovanou BAT v porovnání s kontrolami, po vystavení chladu (Bal, Maurya et al. 2016). Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2016) překvapivě nedetkovali PLB v kosterním svalu, ale v jiných studiích byl PLB v kosterním svalu detekován (Fajardo, Bombardier et al. 2013; Bal, Maurya et al. 2016).

Význam  $\text{Ca}^{2+}$  cyklování byl prokázán ve studii Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012), kde použili dantrolen, inhibitor RyR, aby ukázali důležitost regulace cytoplasmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  na funkčnost svalové NST. Léčba dantrolenem u WT myši vedla k dalšímu poklesu  $T_b$  u jedinců s funkční i ablatovanou BAT, u SLN-KO však dantrolen nevyvolal žádnou další změnu v  $T_b$ . Tento experiment potvrzuje, že RyR řízená cirkulace  $\text{Ca}^{2+}$  je nezbytná pro svalovou NST (Bal, Maurya et al. 2012). K tomuto přispívá fakt, že vystavením chladu dochází ke zvýšení exprese a fosforylace RyR1 (Bal, Maurya et al. 2016). RyR způsobený nárůst cytoplasmatického  $\text{Ca}^{2+}$  vede posléze také ke zvýšení mitochondriálního  $\text{Ca}^{2+}$  aktivující mitochondriální metabolismus (Díaz-Vegas, Cordova et al. 2018).

Na základě koexpresí PLB a SERCA2a v pomalých svalových vláknech a SLN a SERCA1a v rychlých svalových vláknech se dá říci, že PLB bude preferenčně regulovat pomalou isoformu SERCA2a a SLN rychlou isoformu SERCA1a. Tyto koexprese však nejsou absolutní a oba regulační proteiny tedy mohou mít do jisté míry vliv na obě isoformy SERCA. Často také dochází ke koexpresím SLN a PLB což může vést k tzv. superinhibicím (Fajardo, Bombardier et al. 2013). Výsledky různých studií o významu SERCA isoform se však často liší, například Muthu Periasamy a kol. (Periasamy and Kalyanasundaram 2007) tvrdí, že PLB reguluje pouze SERCA2a a nikoli SERCA1a (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007, str. 434), zároveň zde však na základě studie Sumbilla a kol. (Sumbilla, Cavagna et al. 1999) uvádí, že PLB inhibuje SERCA2a, SERCA2b i SERCA1a stejně, ale SERCA3 PLB ovlivněna není (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007, str. 435). Navíc u lidí může být situace jiná. Fajardo a kol. (Fajardo,

Bombardier et al. 2013) zjistili, že SLN je exprimován v rychlých svalových vláknech spolu se SERCA1a a malým množstvím PLB. V pomalých svalových vláknech byla silnější exprese PLB a SLN detekován nebyl. Exprese SERCA1a korelovala s expresí SLN a SERCA2a s expresí PLB (Fajardo, Bombardier et al. 2013). To může značit jiné mechanismy regulace svalové NST mezi myšmi a lidmi. Ve studii Fajardo a kol. určovali typ svalových vláken podle exprese MHC, u studií na myších často exprese různých MHC neurčují a nebere se v úvahu, že experimentální zatížení může změnit exprese různých MHC, což ale může ovlivňovat získané výsledky. Často také dochází k různým kombinacím: exprese isoform SERCA a jejich regulačních proteinů PLB a SLN se mění v závislosti na podmínkách prostředí a fyziologických potřebách jedince. Regulována je jak vývojově, tak neurohormonálně (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). Záleží tedy nejen na typu svalového vlákna, který se opět během vývoje a měnicích se podmínek mění, ale také na organismu a experimentálním přístupu.

Nejen exprese SERCA, ale také exprese SLN je vývojově regulována. Během prenatálního vývoje dochází k vysoké expresi SLN s vrcholem v den narození (Babu, Bhupathy et al. 2007) a poté následuje snížení exprese a pravděpodobné omezení pouze na pomalá svalová vlákna (Babu, Bhupathy et al. 2007). Chladová expozice myši v postnatálním stádiu však dokáže přirozený pokles SLN zvrátit (Pant, Bal et al. 2015). Myši WT mláďata si po chladové expozici, kdy jim byla od 7. dne snižována teplota o 2 °C/den z 22 °C na 4 °C, ve kterých pak byla udržována od 18. do 21. dne věku, dokázala udržet normální tělní teplotu, nedocházelo však u nich k takovému nárůstu tělesné hmotnosti, jako u myši v normální teplotě, který je pro postnatální vývoj typický. Vliv chladové adaptace je tedy silnějším faktorem než vývojově řízené změny v expresi SLN (Pant, Bal et al. 2015). Další změna, provázející postnatální vývoj, je posílení hladin calsequestrinu, tedy pufrovací kapacity SER (Pant, Bal et al. 2015). Pufrovací aktivita calsequestrinu umožňuje SER pojmout větší množství  $Ca^{2+}$  iontů, což následně může vést k efektivnější RyR a SERCA zprostředkované NST. Chlad u myšat navíc také způsobil posílení exprese pomalé SERCA2a oproti kontrolám (Pant, Bal et al. 2015), ale na expresi SERCA1a ani calsequestrinu chlad vliv neměl (Pant, Bal et al. 2015).

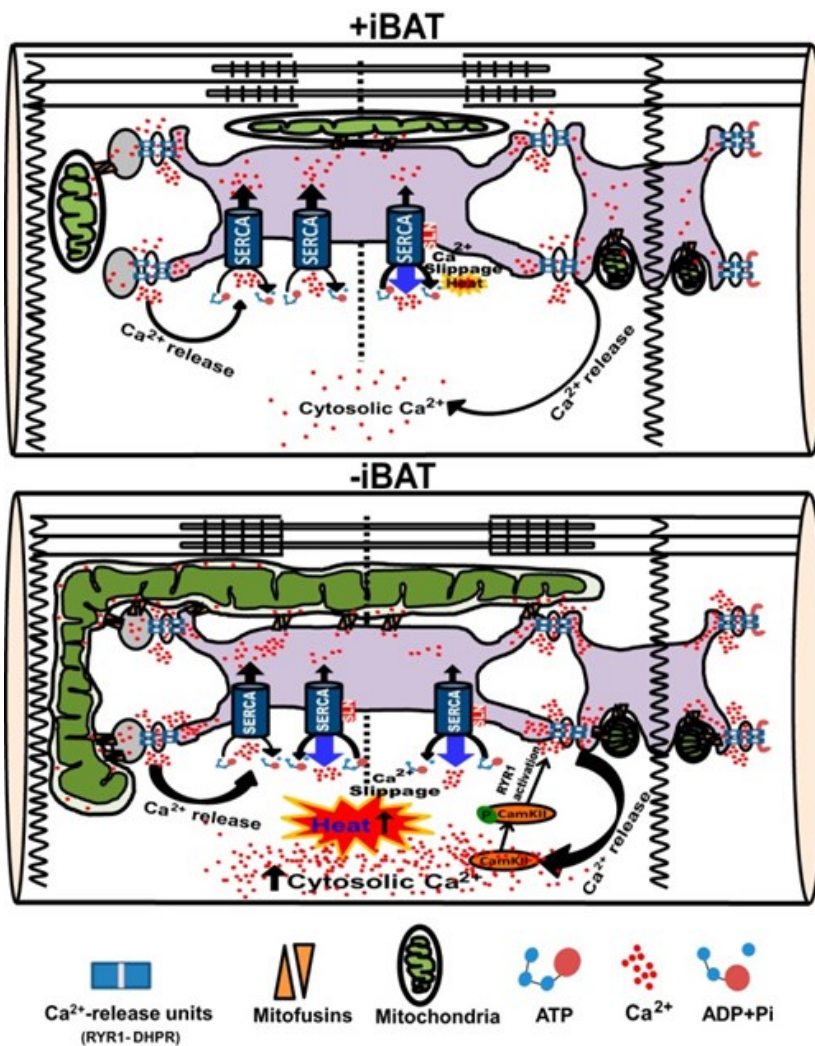
Souhrnem je možno říci, že pokud jsou myši v postnatálním stádiu vystavené chladu, mechanismy NST v BAT nejsou dostačující a dochází u nich k posílení svalové NST závislé na SLN. Aktivita SERCA je regulována především proteiny SLN a PLB a stejně jako je tomu u SERCA, je jejich exprese ovlivněna různými faktory. Změny exprese SLN jsou pak klíčové pro správnou termogenezi během postnatálního vývoje. Regulace těmito proteiny se liší v závislosti na isoformě SERCA. Zdá se, že SLN preferenčně reguluje SERCA1a a PLB

SERCA2a, tyto regulace však nemusí být absolutní. Dalším důležitým proteinem pro svalovou NST je RyR, který reguluje množství cytoplasmatického  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3 Mechanismus svalové NST – role mitochondrií

Na svalovou NST mají klíčový vliv mitochondrie. I mitochondrie procházejí vlivem chladu a v závislosti na potřebách NST změnou metabolismu a morfologickou přestavbou a jejich funkce se významně odráží na schopnosti svalové NST.

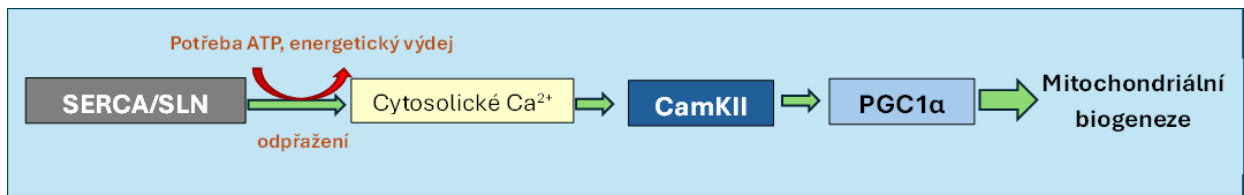
Model snížení NST v BAT pomocí ablace, který vede pravděpodobně k navýšení alternativních způsobů tvorby tepla, jako je třes a NST ve svalu, způsobuje také změny na úrovni mitochondrií v kosterním svalu. Ablace BAT vede k výrazné indukci biogeneze mitochondrií ve svalu, k nárůstu  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě a posílení svalové NST (Bal, Maurya et al. 2016). Když organismus spoléhá na svalovou NST, zvyšuje se zde poptávka po energii, to vede ke zvýšené aktivitě mitochondrií, dochází k tvorbě hustší sítě krist a roste aktivita sukcinát dehydrogenázy, jak bylo dokázáno pomocí elektronového mikroskopu a detekcí funkce mitochondriálního dýchacího řetězce v experimentu, kde adaptace na chlad i ablace BAT vedla také ke zvýšení exprese proteinů dýchacího řetězce (Bal, Maurya et al. 2016). S vyšší poptávkou energie souvisí posílení metabolismu MK v kosterním svalu (které vede např. ke zvýšení exprese lipoproteinové lipázy (LPL). Chlad vede také k morfologickým změnám svalových mitochondrií. Dochází ke zvýšené expresi proteinů zodpovědných za mitochondriální fúzi (mitofusin 1, mitofusin 2, Opa 1), která je také posílena po ablaci BAT (Bal, Maurya et al. 2016). Díky zvýšení exprese mitofusinu 2 u myši s ablací BAT vystavených chladu je poté možné detekovat zvýšení míst propojení mitochondrií a SER (viz obr. 2). K posílení mitochondriálního metabolismu dochází i díky chladem indukovanému posílení exprese napětově závislých aniontových kanálů (VDAC, z angl. voltage-dependent anion channel), které propouštějí  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondrie (Bal, Maurya et al. 2016). Zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  vede k posílení produkce ATP díky stimulaci enzymů Krebsova cyklu, konkrétně  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázy, isocitrátdehydrogenázy a pyruvátdehydrogenázy, mající za následek zvýšení produkce NADH a FADH<sub>2</sub>, a tedy i posílení tvorby  $\text{H}^+$  gradientu (Modesti, Danese et al. 2021). Zvýšenou produkcí ATP opět dochází mimo jiné k posílení aktivity SERCA. Chlad a obecně zvýšený požadavek na svalovou NST vede jak k metabolickým, tak k morfologickým změnám svalových mitochondrií, které mají v konečném důsledku vliv na zvýšení jejich aktivity (Bal, Maurya et al. 2016).



Obr. 2: Model aktivace mitochondriálního metabolismu ve svalu vlivem chladu a mitochondriální a SER přestavby, převzato a upraveno podle (Bal, Maurya et al. 2016); SERCA (sarkoplazmatická/endoplazmatická retikulární Ca<sup>2+</sup> ATPáza), Ca<sup>2+</sup> slippage (skluz Ca<sup>2+</sup>), heat (teplo), Ca<sup>2+</sup> release (uvolnění Ca<sup>2+</sup>), cytosolic Ca<sup>2+</sup> (cytosolická koncentrace Ca<sup>2+</sup>), CamKII (Ca<sup>2+</sup> kalmodulin-dependentní proteinová kináza II), P (fosfát), SLN (sarkolipin), RyR1 (ryanodinový receptor 1), mitochondria (mitochondrie), Ca<sup>2+</sup>-release unit (Ca<sup>2+</sup>-uvolňovací jednotka).

Za zvýšení mitochondriální biogeneze a metabolismu je zodpovědný také SLN, pomocí něhož dochází k nárůstu koncentrace cytoplasmatického Ca<sup>2+</sup>, to vede nejen k většímu vychytávání Ca<sup>2+</sup> mitochondriemi, ale také k indukci signálních drah (Bal and Periasamy 2020). CAMKII dráha aktivovaná zvýšenou koncentrací Ca<sup>2+</sup> spouští dráhu přes transkripční faktor PGC1 $\alpha$  (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$ ), která vede k mitochondriální biogenezi (viz obr. 3) (Maurya, Herrera et al. 2018). Je zajímavé, že i zvýšená fyzická aktivita vede ve svalu k indukci exprese SLN (Bal, Gupta et al. 2021), což koreluje s vyššími nároky na metabolismus mitochondrií a potřebu ATP.





Obr. 3: *SLN zprostředkovaná signalizace mitochondriální biogeneze*, převzato a upraveno podle (Maurya, Herrera et al. 2018); SERCA (sarkoplazmatická/endoplazmatická retikulární  $Ca^{2+}$  ATPáza), SLN (sarkolipin), CamKII ( $Ca^{2+}$  kalmodulin-dependentní proteinová kináza II), PGC1 $\alpha$  (koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxizómů  $\gamma$  1- $\alpha$ ).

Můžeme tedy konstatovat, že zvýšené nároky na svalovou NST mají vliv na aktivitu a morfologii mitochondrií, vedoucí k hustší mitochondriální síti a posílení exprese proteinů s touto přestavbou souvisejících, dále také k posílení exprese proteinů respiračního řetězce a Krebsova cyklu. Za těmito změnami stojí především signalizace spuštěná zvýšenou cytoplasmatickou koncentrací  $Ca^{2+}$ , k čemuž dochází např. při spuštění na SLN závislé svalové NST.

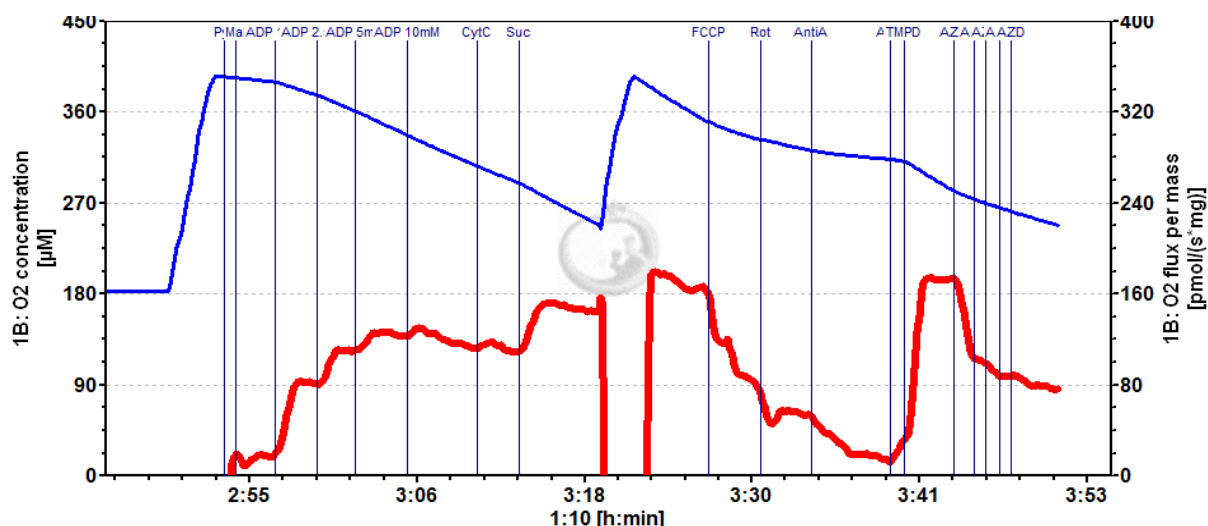
### 3.3.1 Měření mitochondriální respirace

Jednou z metod, jak měřit mitochondriální funkci, je detekce mitochondriální respirace. Mitochondriální respiraci pak může výrazně ovlivňovat odpřažení membránového potenciálu od tvorby ATP pomocí proteinů UCP, které propouštějí protony. Pro kosterní svalovou tkáň je typická exprese UCP3. Mezi další mechanismy vedoucí k průchodu protonů zpět přes mitochondriální membránu bez tvorby ATP patří bazální únik protonů prostou difúzí, nebo za pomoci adenin nukleotidové translokázy. Dále existují různé biologické i syntetické rozpráhovače, které mají stejný účinek (Demine, Renard et al. 2019). Blondin a kol. (Blondin, Daoud et al. 2017) ve studii na lidech ukázali, že časově limitovaná chladová aklimatizace v 10 °C 2 h/den 4 nebo 5 po sobě následujících dnů vždy s dvoudenními přestávkami celkem po dobu 4 týdnů vedla k posunu od svalové třesové a netřesové termogeneze k NST pomocí BAT. Schopnost svalové NST zakládali právě na úniku protonů v oxidativním řetězci, respektive na kvantifikaci odpřaženého mitochondriálního dýchání, kdy v permeabilizovaných svalových vláknech nedochází k fosforylaci ADP na ATP. Kromě odpřažení mitochondrií pomocí odpráhujících proteinů může vznikat teplo v mitochondriích i během mitochondriální respirace a tvorby ATP pomocí ATP syntázy. Na druhou stranu, schopnost mitochondrie tvořit ATP ovlivňuje jak svalový třes tak i SLN dependentní NST (Blondin, Daoud et al. 2017).

Mitochondriální respiraci a aktivitu jednotlivých proteinů oxidační fosforylace v myocytech můžeme měřit pomocí vysokorezoluční respirometrie, a to jak v izolovaných mitochondriích,



buňkách, tak i v kouscích tkání. Při tkáňové analýze je však potřeba narušit membránu buněk tak, aby se k mitochondriím dostaly jednotlivé substráty. Toho můžeme nejjednodušším způsobem dosáhnout mechanicky, při čemž však dochází i k narušení vnitřní struktury buňky. Permeabilizace svalových vláken lze dosáhnout i chemicky, například pomocí saponinů, které přímo nenarušují buněčnou integritu. Samotná analýza pak spočívá v detekci úbytku obsahu  $O_2$  v izolované komůrce obsahující analyzovaný vzorek v pufru, který obsahuje látky upravující zejména osmolaritu prostředí. Aktivitu jednotlivých proteinů dýchacího řetězce můžeme měřit použitím různých substrátů a inhibitorů (viz obr. 4). Pomocí tohoto protokolu dokážeme analyzovat mitochondriální dýchání za specifických podmínek, a tedy aktivitu konkrétních komplexů. Výstupem je pak graf ukazující spotřebu kyslíku, což vypovídá o aktivitě respiračního řetězce v reakci na použité inhibitory a substráty, což nám umožní odečíst aktivitu jednotlivých komplexů (Kuznetsov, Veksler et al. 2008).



**Obr. 4: Měření mitochondriální respirace v permeabilizovaných svalových vláknech (Vlastní data).** K permeabilizovaným svalovým vláknům se po zvýšení koncentrace  $O_2$  v komůrce nejprve přidávají substráty 5mM pyruvát a 2mM malát a následně zvyšující se koncentrace ADP (1mM, 2, 5mM, 5mM, 10mM), během toho dochází k nárůstu mitochondriálního dýchání. Pro kontrolu toho, že mitochondrie nejsou poškozené, se přidává 10  $\mu$ M cytochrom. Následné přidání 10mM sukcinátu, substrátu komplexu II., nám poskytne informaci o jeho fungování, dochází k nárůstu respirace. V dalším kroku přidáme 0, 5  $\mu$ M karbonyl kyanid-p-trifluormetoxifenylhydrazon (**FCCP**), odpráhující protein dýchacího řetězce, což vede k maximální mitochondriální respiraci. Následné přidání 2  $\mu$ M rotenonu, inhibitoru komplexu I, nám umožní odečíst aktivitu tohoto proteinu, získáme tím aktivitu dýchacího řetězce bez komplexu I. Vidíme tak dýchání závislé pouze na aktivitě komplexu II, tedy oxidaci sukcinátu na malát a přenos elektronů z této reakce. Dále přidáváme 5mM Antimycin A, inhibitor komplexu III., který nám umožní odečíst aktivitu tohoto komplexu. V tomto momentu vidíme tzv. leak – pokles mitochondriálního dýchání, je to zapříčiněno tím, že po inhibici komplexu III nedochází k přenosu elektronů, elektrony z komplexu II se předávají na ubichinon, ale nemohou se předávat dál, způsobí to úplné odprážení mitochondriálního dýchání – v dýchacím řetězci se

*v tento moment nepřenáší elektrony. Aktivitu komplexu IV detekujeme přidáním umělého substrátu 100  $\mu\text{M}$  N, N', N'-tetramethyl-p-fenylendiamin (TMPD), který v jeho redukovaném stavu dodává elektrony cytochromu c. TMPD je však náchylný k autooxidaci, proto je nezbytné těsně před ním přidat 2mM askorbát, který TMPD udržuje v redukovaném stavu. V posledním kroku je přidáván azid ve finální koncentraci  $\geq 100\text{mM}$ , inhibitor komplexu IV.*

Souhrnem je možno říci, že měření mitochondriální respirační kapacity nám může poskytnout informace o schopnosti NST v tkáni. Pomocí různých protokolů pak můžeme měřit aktivitu jednotlivých komplexů respiračního řetězce.

### 3.4 Interakce netřesové termogeneze s lokomocí

Jedním z témat výzkumu je, jak a jestli vůbec ovlivňuje svalová NST, tedy odpráhuující funkce SLN na SERCA, schopnost svalové kontrakce, když právě pro svalovou kontrakci je klíčová správná funkce proteinu SERCA, který je nezbytný k odčerpání  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ze sarkoplasmu a tím umožnit svalovou relaxaci.

Míra SLN zprostředkovaného odpojení hydrolyzy ATP od transportu  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí SERCA může záviset na různých faktorech: a) poměr SLN/SERCA; b) koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu; c) koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v lumen SR; d) dostupnost ATP v buňce; e) další doposud nedefinované faktory (Bal, Sahoo et al. 2018). Bal a kol. (Bal, Sahoo et al. 2018) ve své studii ukázali, že účinnost odpojení SERCA pomocí SLN není absolutní, exprese SERCA je v nadbytku, a tak svalová NST nenarušuje lokomoční funkci svalu. I přesto je však svalová NST velice účinná a může hrát důležitou roli v termogenezi, neboť svaly tvoří 40 % tělesné hmotnosti (Maurya, Bal et al. 2015), a proto i malý nárůst výdeje energie na jednotku hmotnosti výrazně ovlivňuje celotělovou termoregulaci.

Jednou z teorií je, že NST s lokomocí neinteraguje. Dokladem pro to je, že u myši s nadměrnou expresí SLN nebylo prokázáno ovlivnění lokomoční funkce (Bal, Sahoo et al. 2018). K tomu, aby NST nebránila lokomoci a svalovému třesu, přispívá i exprese rychlé isoformy SERCA1a v rychlých svalových vláknech, protože rychlé odčerpání  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu umožní vyšší kontraktilitu. Aktivita SERCA se zvyšující se koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  zvyšuje, což má za následek rychlejší odčerpávání  $\text{Ca}^{2+}$  zpět do SER. Důležitá je také pufrovací kapacita lumen SER, která je regulována calsequestrinem. Čím vyšší je pufrovací kapacita lumen SER, tím může být SERCA aktivnější. V neposlední řadě je důležité dostatečné množství ATP, což opět souvisí s aktivitou mitochondrií. Odpráhuující funkce SLN je závislá na vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  na SERCA a mitochondriální metabolismus je aktivován vstupem  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondrií (Bal, Maurya et al. 2016).

Je možné, že během SLN indukované svalové NST však nemusí docházet k uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  přes RyR, koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v sarkoplazmě zůstává stejná a ke svalové kontrakci dochází bez nutné depolarizace sarkolemy (de Meis, Arruda et al. 2005).

Druhá z teorií je založena na předpokladu, že NST s lokomocí interaguje a snižuje schopnost svalové koordinace, případně maximálního výkonu. Tomu by napovídal fakt, že svalový třes posiluje expresi SLN a SERCA. Při třesu je vysoký únik  $\text{Ca}^{2+}$  ze SER, což rekrutuje myosin ATPázu, a zároveň je vysoká cytosolická koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , která snižuje interakci SLN-SERCA. Postupně dochází k přechodu od tvorby tepla pomocí třesu ke svalové NST, která je aktivována zvýšením hladin  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu pomocí RyR nebo  $\text{Ca}^{2+}$  kanály v sarkolemě (Bal, Sahoo et al. 2018) a dochází k aktivaci CAMKII dráhy vedoucí k fosforylaci RyR1.

V tuto chvíli tedy otázka, zda fyzická aktivita, třesová a netřesová termogeneze spolu nějakým způsobem interagují, zůstává otevřená a jsou zde nutné další výzkumy.

### 3.5 Změna typů svalových vláken v souvislosti s adaptací k chladu

K dalším změnám, ke kterým v těle organismu dochází, jsou změny na úrovni typu exprimovaných svalových vláken, kdy se vlivem chladu zvyšuje exprese pomalých na úkor rychlých svalových vláken. Dobrým model pro studium těchto vlivů je použití myši s narušenou schopností NST v BAT (ablace BAT, UCP1-KO modely).

Pozvolná chladová expozice vede k navýšení množství pomalých svalových vláken, což ukázali ve své studii Rowland a kol. (Rowland, Bal et al. 2015), když na chlad pozvolně adaptovaní jedinci UCP1-KO vykazovali z makroskopického pohledu výraznější zčervenání svalů v porovnání s WT. U UCP1-KO myši byl také v m. soleus a oblasti m. quadriceps s větším obsahem oxidativních vláken a bránici po chladové adaptaci detekován SLN, zatímco u WT byl detekován pouze v bránici (Rowland, Bal et al. 2015). WT myši, tedy myši s funkční NST v BAT se tedy spoléhají na produkci tepla pomocí BAT, zatímco u myši postrádajících tuto schopnost (UCP1-KO) dochází k posunu k pomalým svalovým vláknům. O tendenci k posunu od rychlých svalových vláken směrem k pomalým vlivem akutního chladu svědčí i změny v metabolismu mitochondrií. Osmidenní akutní chlad způsobil u myši s ablatovanou BAT mnohem vyšší nárůst celotělového metabolismu než u kontrol, měřeno na základě příjmu (konzumace) kyslíku. U myši s ablatovanou BAT došlo ve svalu m. tibialis anterior, pro který je typická exprese rychlých svalových vláken, k posílení mitochondriální biogeneze a nárůstu množství tukových kapének. Na základě vizualizace pomocí elektronového mikroskopu bylo ukázáno, že mitochondrie obsahovaly pravidelněji uspořádané a hustěji organizované krysty

(Bal, Maurya et al. 2016). Dochází tedy k pravděpodobnému posílení mitochondriální aktivity. Metabolismus svalu vykazoval nárůst oxidativního metabolismu, o tom vypovídá zvýšená exprese sukcinát dehydrogenázy v m. tibialis anterior u chladově adaptovaných myší s ablatovanou BAT v porovnání s chladově adaptovanými jedinci bez ablace BAT. Po vystavení chladu došlo také k posílení exprese proteinů elektron transportního řetězce, měřeno pomocí metody western blot a denzitometrie, přičemž k většímu nárůstu došlo u myší s ablatovanou BAT. U myší s ablací BAT došlo po vystavení chladu ke zvýšené utilizaci MK (zvýšení MK, LPL v kosterních svalech, snížení množství triglyceridů v séru) (Bal, Maurya et al. 2016).

Nárůst pomalých oxidativních vláken při zvýšených požadavcích na termogenezi je výhodný z několika důvodů. Oproti rychlým glykolytickým vláknům mají ta oxidativní nižší energetické nároky a využívají substrát, který není nezbytný pro funkci dalších tělních orgánů, především mozku. Glykolytický sval je také hlavním místem pro rychlou lokomotorickou funkci, je důležitý pro přežití např. při útěku před predátorem a není tedy vhodný pro svalovou NST. Využitím oxidativních svalových vláken se tedy snižuje i případná interference mezi třesem a motorickou funkcí svalu (Bal and Periasamy 2020). Oxidativní svaly mají také větší množství mitochondrií, které pomocí oxidativního metabolismu produkují dostatečné množství ATP pro energetické nároky termogeneze. Další výhodou oxidativních vláken pro NST je vyšší odolnost proti únavě a exprese pomalé isoformy SERCA2a, která je vhodnější pro svalovou NST (Babu 2020).

V remodelaci svalových vláken od rychlých k pomalým nehraje roli pouze chlad. Snížením tělesné hmotnosti dochází u lidí k posílení oxidativního metabolismu svalu a rekrutuje se MHC I typická pro pomalý sval. Také dochází k posílení exprese pomalé SERCA2 a naopak k poklesu rychlé SERCA1. Posílení exprese MHC I po redukci tělesné hmotnosti může souviset s nejnižší potřebou ATP této isoformy pro svalový stah (Baldwin, Joannisse et al. 2011). Naopak podáním leptinu došlo k opětovnému nárůstu glykolytického kosterního metabolismu a k posílení exprese MHCII. Je zajímavé, že na expresi isoform SERCA měla vliv pouze redukce hmotnosti, nikoli však léčba leptinem (Baldwin, Joannisse et al. 2011). Nárůst glykolytického metabolismu ve svalu a posílení exprese na ATP více náročných isoform MHC II po podání leptinu může působit jako ochrana před obezitou, protože leptin se v těle vyplavuje při vysokém zastoupení tukové hmoty a glykolytický metabolismus a MHCII jsou energeticky náročnější (Baldwin, Joannisse et al. 2011).

Nízký poměr svalových vláken typu I ke svalovým vláknům typu II je spojen s obezitou (Wade, Marbut et al. 1990), k tomuto posunu dochází také vlivem vysokotukové diety (**HFD**, z angl. high-fat diet), která vedla k vyšší expresi MHCII v kosterním svalu (Camera, Burniston et al. 2017). Vyšší zastoupení vláken typu II na úkor vláken I. typu má výrazné dopady na svalový i celotělový metabolismus, ale také např. na rozvoj inzulínové rezistence a diabetu. Vlákná I. typu vykazují vyšší glukózový metabolismus (Albers, Pedersen et al. 2014) a mohou tedy jedince chránit před rozvojem diabetu. Jejich oxidativní a lipidový metabolismus také zabraňuje ukládání tuku ve svalu (Serrano, Hyatt et al. 2023). Dalším rozdílem mezi oběma typy svalových vláken, který může souviset s rozvojem obezity, je nižší proteinový obrát ve svalech s nízkým zastoupením vláken typu I, protože syntéza proteinů je energeticky náročný proces, který může udržovat vyšší metabolismus i v klidovém stavu. Tyto faktory souvisí s větším množstvím mitochondrií ve svalu, kde je větší poměr vláken typu I ke vláknům II. typu. Expresí obou typů svalových vláken souvisí také s fyzickou aktivitou, která zvyšuje zastoupení vláken I. typu, která jsou pomaleji unavitelná, naopak fakt, že svalová vlákna typu II jsou rychleji unavitelná může vést k menší fyzické aktivitě obézních jedinců (Tucker, Tucker et al. 2013; Serrano, Hyatt et al. 2023). Vyšší zastoupení vláken typu II u obézních jedinců vede tedy kromě snížení celkového metabolismu, náchylnosti k obezitě a další metabolickým nemocem také k nižší fyzické aktivitě.

Na zastoupení obou druhů svalových vláken má vliv kromě chladové expozice i hladovění, kdy obě z těchto situací vedou ke zvýšení poměru oxidativních ke glykolytickým svalovým vláknům. Mezi důvody, proč k tomuto dochází, může být šetření glykogenu potřebného dalšími orgány a pro lokomotorickou funkci, dále také zamezení interference mezi oxidačními a pro lokomotorickou funkci klíčovými glykolytickými vlákny. Expresí jednotlivých typů svalových vláken pak úzce souvisí s rychlostí metabolismu a sklonem k obezitě.

### 3.6 Důkazy NST na geneticky modifikovaných modelech

Za účelem studia NST, jako je interakce mezi svalovou NST a NST v BAT, studium délky aktivace obou druhů NST a jejich vlivu na energetický metabolismus, se používají modifikované myši kmeny. Nejčastěji se jedná o UCP1-KO myši (myši postrádající UCP1), tedy s nefunkční NST v BAT a SLN-KO myši (myši postrádající SLN), tedy bez schopnosti SLN zprostředkované svalové NST, případně o SLNxUCP1 dKO myši (myši postrádající jak SLN, tak i UCP1), kterým chybějí klíčové proteiny pro tyto mechanismy NST. Mezi další způsob studia patří např. ablace BAT, nebo léčba pomocí kurare, potlačující svalový třes.

Myši s vyřazenými dvěma geny, tedy SLN-KO a UCP1-KO, aklimatizované v 28 °C měly po akutní chladové expozici (4 °C) výraznější pokles  $T_b$  než stejným podmínkám vystavené SLN-KO (Rowland, Bal et al. 2015). To značí, že mechanismy NST závislé na BAT, potažmo na SLN se navzájem mohou nahradit. Pokud však dojde k absenci obou mechanismů, organismus není schopen si udržet stálou  $T_b$ .

Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012) ukázali, že pokud dojde ke ztrátě jednoho z mechanismů NST, ochranu před hypotermií dokáží zajistit zbývající mechanismy. Je možné, že svalová NST je u laboratorních myších modelů významnější než NST v BAT. Pro studium této otázky byly použity modely SLN-KO myši a deplece BAT u kontrolních myši. Myši byly aklimatizovány ve 30 °C nebo 22 °C. Myši s funkční svalovou NST a nepřítomnou BAT vykazovaly po chladové expozici (4 °C) pouze mírné snížení teploty oproti WT. U myši bez svalové NST (SLN-KO) a s funkční BAT docházelo k výraznějšímu poklesu teploty po 2 h chladové expozici (4 °C) než u kontrol, a to jak po 22 °C, tak po 30 °C aklimatizaci. Z těchto experimentů je patrné, že pouze třesová termogeneze není dostačující k udržení normotermie v chladu (Bal, Maurya et al. 2012). SLN-KO s funkční BAT aklimatizované v 30 °C měly po vystavení akutnímu chladu (4 °C) nižší  $T_b$  než myši z 22 °C. V teple dochází k postupné degradaci termogenní funkce BAT, je však možné, že i svalová vlákna procházejí vlivem zvýšené teploty přestavbou vedoucí k méně výkonné termogenní aktivitě (Bal, Maurya et al. 2012).

U myši by mohla být primárním mechanismem termogeneze po akutním vystavení chladu (4 °C) NST pomocí BAT. Na to poukazují výsledky Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2016), které ukazují, že u WT myši s ablatovanou BAT došlo k rychlému rozvoji třesu po vystavení chladu, třes se však v závislosti na délce chladové aklimatizace (po 4 dnech) snižoval, což naznačuje, že myši postupně začínaly více využívat mechanismus svalové NST. O tom, že za normálních podmínek je primárním mechanismem termogeneze u myši NST v BAT, vypovídá i studie Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012) kde myši bez schopnosti svalové NST (SLN-KO) a kontrolní myši z 22 °C vykazovaly po akutní chladové expozici (2 h 2 °C) podobný metabolismus. Obě skupiny měly zachovanou schopnost NST v BAT a jejich podobný metabolismus naznačuje, že využily pro tvorbu tepla pravděpodobně ji (Bal, Maurya et al. 2012).

U WT myši s ablatovanou BAT docházelo k vyššímu nárůstu metabolismu po vystavení chladu, než u kontrol (Bal, Maurya et al. 2016). To může být způsobeno většími energetickými nároky na třesovou termogenezi (která je bez přítomnosti BAT primárně aktivována). Po adaptaci na chlad (9 dnů) se však rozdíl v metabolismu mezi kontrolami a myšmi bez BAT snižovaly (Bal,

Maurya et al. 2016), což naznačuje přesun obou skupin k NST pomocí svalů. Naproti tomu Rowland a kol. (Rowland, Bal et al. 2015) ukázali, že spotřeba kyslíku se s pozvolnou chladovou expozicí mezi myšimi kmeny nevyrovnává. UCP1-KO měly ve 4 °C nižší spotřebu kyslíku než SLN-KO, což může vypovídat o tom, že NST pomocí UCP1 je energeticky náročnější, nebo o tom, že při pozvolné chladové adaptaci je důležitější termogenní funkce pomocí SLN a tedy je pro SLN-KO energeticky náročnější udržet teplotu a proto mají vyšší metabolismus (Rowland, Bal et al. 2015). Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012) však vystavoval myši akutnímu chladu, kdy je důležitějším mechanismem NST v BAT, proto se mohou výsledky lišit. O největší metabolické zátěži myši UCP1-KO pozvolně adaptovaných na chlad svědčí i pokles hmotnosti viscerálního tukového depa (přepočítáno na tělesnou hmotnost). Hmotnost viscerálního tukového depa přepočtena na procento tělesné hmotnosti se více snížila u UCP1-KO než u SLN-KO. U SLNxUCP1 dKO byl tento pokles nejvyšší a u WT ke změně téměř nedošlo (Rowland, Bal et al. 2015). To opět ukazuje, že pro pozvolnou chladovou adaptaci je nejdůležitější NST pomocí BAT, protože pro UCP1-KO byly energetické náklady na udržení stálé tělesné teploty nejvyšší.

O důležitosti svalové NST dále svědčí to, že myši WT s ablatovanou BAT ošetřené kurare (inhibice třesu), tedy s funkčním mechanismem svalové NST a omezenou třesovou termogenezí, měly pouze mírné snížení  $T_b$  po akutním vystavení chladu. Naopak SLN-KO s funkční BAT po aplikaci kurare, tedy s funkčním mechanismem NST v BAT a omezeným svalovým třesem, měly po vystavení chladu výrazné snížení  $T_b$ . BAT tedy kompenzuje ztrátu svalové NST jen omezeně a svalová NST je výkonnější. Je zajímavé, že použití kurare nemělo vliv na celotělový metabolismus (měřeno pomocí spotřeby kyslíku) (Bal, Maurya et al. 2012). Je však důležité brát v úvahu, že pokud by bylo kurare použito v takové míře, aby dokonale inhibovalo svalový třes v myši, došlo by také k inhibici dýchacích svalů a udušení myši. Na výsledky studie tedy může mít vliv i částečně funkční svalový třes. U SLN-KO myši s funkční BAT po použití kurare došlo k výraznějšímu poklesu  $T_b$  v prvních hodinách chladové expozice, po delší době se  $T_b$  těchto myši srovnaly se SLN-KO myšmi s BAT bez použití kurare. To značí, že třesová termogeneze je důležitá pouze v prvních hodinách chladového stresu (Bal, Maurya et al. 2012).

Souhrnem, podle výsledků Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2016) je primárním mechanismem NST v BAT, pokud chybí, dochází ke svalovému třesu, postupně je však vždy aktivována výkonná svalová NST, což koreluje i s výsledky Bal a kol. (Bal, Maurya et al. 2012) po použití kurare: pokud byla funkční pouze výkonná svalová NST, nedocházelo k hypotermii, avšak

pokud organismus mohl využívat pouze mechanismy v BAT a třesovou termogenezi, které slouží pro primární (akutní) odpověď na chlad, k hypotermii došlo. Svalová NST je tedy nezbytná pro dlouhodobou termogenezi.

### 3.7 Interakce mezi mechanismy NST a dietou indukovanou obezitou

Diskutována je také role SLN v ochraně před dietou indukovanou obezitou (**DIO**). Myši bez SLN vykazovaly výrazný nárůst hmotnosti a zvětšení tukového depa po HFD v porovnání s kontrolami. Naproti tomu WT myši krmené HFD vykazovaly zvýšenou expresi SLN. HFD vyvolala také zvýšenou expresi UCP1 v BAT u obou skupin. Mechanismy NST tedy mohou hrát důležitou roli také při metabolickém přetížení, jako ochrana před obezitou (Bal, Maurya et al. 2012). Námítky k této studii však byly diskutovány ve studii autorů Nedergaard a Cannon, kteří upozornili na to, že zvýšená exprese transkriptů UCP1 nemusí vypovídat o zvýšení funkčního proteinu v tkáni (Nedergaard and Cannon 2013). Bal a kol. (Bal, Sahoo et al. 2018) použili dva myší modely: SLN-OE s nadměrnou expresí SLN podobnou produkci SLN velkými savci, čehož bylo dosaženo použitím lidského kosterního  $\beta$ -aktinového promoteru (Maurya, Bal et al. 2015) a SLN-KO. Myši se zvýšenou expresí SLN vykazovaly zvýšený bazální metabolismus (**BMR**, z angl. basal metabolic rate), spotřebu kyslíku a ztrácely hmotnost tukových dep, naopak myši SLN-KO nabývaly na váze a spotřebovávaly méně kyslíku. Nadměrná exprese SLN také chránila myši před dietou indukovanou obezitou, svalovou lipotoxicitou a tím spojenými dalšími metabolickými poruchami (Bal, Sahoo et al. 2018). Také výsledky studie Rowland a kol. (Rowland, Bal et al. 2015) ukazují důležitost SLN a UCP1 v ochraně před obezitou, protože po expozici obezitogenní dietě UCP1xSLN dKO myši a myši SLN-KO vykazovaly nejvyšší tělesnou hmotnost, nižší hmotnost měly myši UCP1-KO a nejnižší hmotnost měly kontrolní myši. Role SLN v ochraně před DIO spočívá i ve schopnosti regulovat mitochondriální biogenezi a metabolismus tím, že zvýšením hladin  $Ca^{2+}$  dokáže ovlivňovat signální dráhy (Maurya, Bal et al. 2015).

Za zmínku stojí také vliv hormonů štítné žlázy na mechanismy svalové NST a DIO. Hypotyreóza, a to již v gestačním období, působí inhibičně na expresi SERCA a posiluje expresi PLB, čímž SERCA opět inhibuje. Hypertyreóza působí přesně naopak. To může mít vliv na metabolismus a na náchylnost k obezitě (Baldwin, Joannisse et al. 2011).

Sympatický nervový systém (**SNS**) hraje klíčovou roli v regulaci svalové termogeneze. Na nervosvalové ploténce (**NMJ**, z angl. neuro-muscular junction) dochází ke kontaktům motorických svalových vláken a motorických nervů a k modulaci přenosu signálu na svalové



vlákno. Ukázalo se, že sympatektomie, a to jak mechanická, tak i chemická, vede ke stejným účinkům jako svalová denervace motorických nervů (Rodrigues, Messi et al. 2019).

Zdá se, že mechanismem zodpovědným za dietou indukovanou termogenezi (**DIT**) by mohla být vedle NST pomocí SLN a NST v BAT zodpovědná i sympatická odpověď pomocí  $\beta$ -adrenergní signalizace. Myši SLN-KO vykazovaly stejně jako WT nárůst celotělového metabolismu v důsledku krmení HFD. Po léčbě propranololem (antagonistou  $\beta$ -AR) došlo k úplné inhibici DIT u SLN-KO, zatímco na WT myši neměl propranolol žádný vliv. HFD také pouze u SLN-KO myši vedla k výraznému nárůstu katecholaminů v plazmě. Tato fakta dokazují klíčovou roli SNS v regulaci DIT ve svalu (Bombardier, Smith et al. 2013).

Souhrnem je možno říci, že mechanismy NST tělo pravděpodobně využívá kromě zdroje tepla také jako ochranu před DIO, neboť tyto mechanismy stojí za vysokým výdejem energie.

### 3.8 Superinhibovaný stav myosinu

Dalším relativně recentně diskutovaným mechanismem svalové termogeneze je přechod myosinu mezi inhibovaným a tzv. superinhibovaným (**SRX**) stavem, pro který je typická velmi nízká aktivita ATPázy. Ukazuje se, že přechod 20 % hlav myosinu z SRX do normálního uvolněného stavu vede ke zdvojnásobení svalového metabolismu. Stavy myosinu, tedy inhibovaný a superinhibovaný, jsou regulovány fosforylací lehkého řetězce myosinu. Cooke a kol. (Cooke 2011) diskutují potenciální ovlivnění fosforylace a tedy stavu svalových hlav jako možnost boje proti obezitě a diabetu II. typu. Přechod mezi stavy myosinu může hrát také důležitou roli v DIT, regulaci ATPázové aktivity a tím i energetického výdeje. Cooke tvrdí, že právě stavy myosinu mohou mít zásadní vliv na to, proč někteří jedinci přibývají na váze více a někteří méně po stejném navýšení příjmu potravy, a vyvrací tak hypotézu, že za tímto fenoménem stojí **NEAT** (z angl. nonexercise activity thermogenesis) (Cooke 2011).

## 4 Řízení svalové termogeneze

### 4.1 Řízení na úrovni hypotalamu

Hypotalamus je klíčovým místem pro regulaci homeostázy celého těla, je tedy důležitý i v regulaci tělní teploty a energetické homeostázy těla, nebo např. příjmu potravy. Může mít tedy zásadní roli v reakci na DIO stejně jako na faktory související s metabolickým syndromem.

Landsberg a kol. (Landsberg 2006) poukázali na vztah mezi obezitou, diabetem a hypertenzí v souvislosti s aktivitou SNS. Ochranným mechanismem proti DIO by mohlo být zvýšení energetického výdeje. K tomu může vést mimo jiné aktivace SNS v srdci i v BAT (Young,

Saville et al. 1982). Dieta s vysokým obsahem tuků a sacharidů vede k indukci aktivity SNS (Schwartz, Young et al. 1983), zatímco proteiny ve stravě aktivitu SNS nestimulují (Kaufman, Young et al. 1986). Aktivita SNS je regulována hladinami insulinu a glukózy, k čemuž nasvědčují poznatky, že insulinem vyvolané hypoglykemie stejně jako blokace metabolismu glukózy vedou ke snížené aktivitě SNS (Rappaport, Young et al. 1982), naopak vysoké hladiny insulinu a glukózy aktivitu SNS indukují (Young 1988). Na hladiny glukózy a insulinu jsou citlivé především hypotalamické neurony. Stimulací dřeně nadledvin hypoglykemií nebo 2-deoxyglukózou (produkce adrenalinu) dochází k potlačení aktivity SNS. Celý proces regulace potlačení SNS spočívá v sestupné inhibici. Model regulace je následující: hladovění vede k nižší hladině insulinu, což má za následek nízkou hladinu glukózy ve ventrálně-mediálním hypotalamu (VMH). Toto indukuje inhibiční dráhu do sympatických center a následně vede ke snížení funkce SNS. A naopak příjem sacharidů vede k posílení metabolismu sacharidů ve VMH a vypnutí inhibiční dráhy do sympatických center, tím se následně zvýší stimulace SNS (Landsberg and Young 1985). Dalším regulátorem aktivity SNS je leptin, jehož funkce je kromě potlačení chutě k jídlu také aktivace SNS (Dunbar, Hu et al. 1997; Landsberg 2006).

Výše uvedené faktory vedoucí ke zvýšené aktivitě SNS jsou spojeny s nadměrným příjmem energie. S obezitou spojená insulinová resistance, tedy i vysoké hladiny insulinu a vysoká hladina glukózy v krvi, vedou již zmíněným mechanismem k aktivaci SNS, stejně jako nadměrným přísunem energie (tuků a sacharidů) aktivovaný SNS za účelem zvýšení energetického výdeje (Landsberg 1986). Na rozdíl od svalů nevzniká u buněk nervového systému (NS) insulinová resistance (O'Hare, Minaker et al. 1989), což vede k tomu, že změny metabolismu vyvolané aktivitou NS jsou stálé, nedochází ke zhoršenému příjmu glukózy po dlouhodobě vysokých hladinách glukózy v krvi a vysoká glukóza v krvi tedy stále aktivuje SNS. Tím je modulován svalový metabolismus tak, aby se adaptoval na příjem glukózy, tedy nespaloval MK. K příjmu glukózy ale kvůli svalové resistenci nedochází, což v konečném důsledku vede k produkci ketolátek (Landsberg 2006).

Vasomotorickou funkci má především neuropeptid Y (NPY) v souhře s noradrenalinem (NA), který je vyplavován při aktivaci sympatiku, a je tak možným přispěvatelem k hypertenzi. NPY je vyléván především v reakci na stres (chladový stres, krvácení). Potencuje vliv NA a předpokládá se, že spolu s NA stojí za vasokonstrikčními účinky sympatiku (Hodges, Jackson et al. 2009).

Dlouho se předpokládalo, že sympatikus má pouze nepřímý vliv na svalovou aktivitu, například pomocí regulace průtoku krve cévami ve svalu. Pomocí detekce exprese TH bylo dokázáno, že sympatické nervy inervují nejen cévy ve svalu, ale také přímo svalová vřeténka (Radovanovic, Peikert et al. 2015), jejichž hlavní funkcí je regulace svalového tonu. Za stresových podmínek, kdy je aktivován sympatikus, tedy v reakci „fight or flight“ (boj nebo uteč), dochází vlivem sympatiku k nižší citlivosti svalového vřeténka (Passatore and Roatta 2006). Sympatický systém negativně působí na zpětnovazebnou kontrolu délky svalového vlákna (Schwartzman and Kerrigan 1990), snižuje se tedy přesnost ovládnání pohybu, která není pro reakci „fight or flight“, vyvolanou SNS, klíčová. Zda je svalové vřeténko i pod sympatickou inervací byla dlouho otázka, v této studii to však Radvanovic a kol. (Radovanovic, Peikert et al. 2015) potvrdili nejen detekcí TH v blízkosti svalových vřetének pomocí imunofluorescenčního barvení, ale také detekcí NPY receptorů, opět pomocí imonofluorescenčního barvení, na svalových vřeténkách.

Přestože stárnutí, tedy zhoršení svalové inervace SNS i motoneurony, vede k omezení sympatické sítě vedoucí ke svalovým vláknům a NMJ, axony SNS obklopující krevní cévy ve svalech zůstávají zachovány (Rodrigues, Messi et al. 2019), což je důležité pro správné krevní zásobení svalu, tedy dostatečný přísun živin a látek modulujících funkci svalu.

Můžeme říci, že SNS je klíčovým hráčem v regulaci homeostázy celého těla. Má důležitý vliv na metabolismus, kdy hraje nezbytnou úlohu v ochraně před DIO, neboť k jeho aktivaci dochází mj. zvýšenou koncentrací glukózy a insulínu v krvi. Přímý vliv má sympatikus také na sval, kdy ovlivňuje regulaci a přesnost pohybu v reakci „fight or flight“.

## 4.2 Orexin

Orexin je spolu s insulinem důležitým regulátorem metabolismu glukózy. Sekrece orexinu v orexinových neuronech hypotalamu jsou spojené s vysoce odměňovaným a motivovaným chováním, tedy s hédonickým krmením, hledáním potravy a závislostí (Harris, Wimmer et al. 2005; Sakurai, Takamura et al. 2007). To může souviset s orexinem podmíněnou stimulací NPY neuronů v jádře hypotalamu *n. arcuatus*, které na metabolismus glukózy sice přímý vliv nemají, ale jejich indukci dochází ke zvýšení příjmu potravy (Horvath, Warden et al. 1999). Expese mRNA orexinu je indukována potravou s obsahem sacharinu a glukózy (Furudono, Ando et al. 2006), což odkazuje na důležitou roli přijetí potravy ústy v signalizaci. Je zajímavé, že Orexin-KO myši nevypily takové množství roztoku sacharózy, jako WT (Shiuchi, Haque et al. 2009), což odkazuje na již zmíněný mechanismus zvýšení příjmu potravy na základě orexinem

podmíněné stimulace NPY neuronů. Indukce exprese orexinu po podání glukózy a jeho vliv na SNS souvisí s DIT. Po příjmu potravy dochází k nárůstu NA a koncentraci insulinu v plazmě (Diamond, Brondel et al. 1985). Vzájemné působení NA a orexinu vede k posílení glukózového metabolismu, přičemž orexin působí přes  $\beta$ -AR. O důležité roli SNS v DIT vypovídá i další studie (LeBlanc and Brondel 1985), která prokázala, že u lidí chutné jídlo vyvolává vyšší termogenní odpověď, než nedobré jídlo, nebo jiná studie, kde Astrup a kol. (Astrup, Christensen et al. 1990) ukázali nezbytnost  $\beta$ -AR signalizace tím, že blokádu  $\beta$ -AR inhibovali další příjem glukózy po jídle bohatém na sacharidy. Také se ukázalo, že myši, stejně jako lidé, měly v reakci na krmení žaludeční sondou sníženou termogenezi a sklon k obezitě (Rothwell and Stock 1978), je tedy možné, že u nich nedocházelo k DIT a naopak orálně podávané sacharidy vedly k aktivaci sympatické signalizace (Young and Landsberg 1977). S tím souvisí zjištění, že orexin injikovaný do VMH zvyšuje vychytávání glukózy v pomalých svalových vláknech bohatých na mitochondrie, a tím zvyšuje svalový metabolismus (Shiuchi, Haque et al. 2009). Orexin bývá spolu s insulinem vyplavován po jídle a podmiňuje insulinem vyvolané vychytávání glukózy v kosterním svalu. Shiuchi a kol. prokázali souhru vlivu insulinu a orexinu, při vzájemném působení obou faktorů docházelo k nejvyššímu metabolismu glukózy, příjmu glukózy do tkání a tvorbě glykogenu (Shiuchi, Haque et al. 2009).

Neurony citlivé na orexin se nacházejí ve VMH, jejich excitace vede ke zvýšení sympatické signalizace a k zvýšení metabolického obratu, což vede k regulaci koncentrace krevní glukózy. Tyto neurony mají vliv i na spánek, bdělost a hledání odměny (Harris, Wimmer et al. 2005). Indukcí receptoru orexinu ve VMH dochází k aktivaci svalových sympatických nervů a  $\beta$ 2-AR signalizace. Stimulací orexinových receptorů ve VMH dochází i k posílení vyplavování NE. Důležitým přispěvatelem k posílení glukózového metabolismu po jídle je i leptin (Kamohara, Burcelin et al. 1997), jehož signalizace také souvisí s mediálním hypotalamem, kde indukuje sympatickou signalizaci a následně dochází k stimulaci  $\beta$ -AR k ovlivnění cílových buněk (Haque, Minokoshi et al. 1999). Orexin zprostředkovává zvýšené vychytávání glukózy pomocí SNS indukci  $\beta$ 2-AR signalizace. K posílení metabolismu glukózy po VMH injekci orexinu došlo pouze u pomalých a smíšených kosterních svalů, na rychlé svaly a WAT vliv neměla (Shiuchi, Haque et al. 2009). Důležitost  $\beta$ 2-AR signalizace pro orexinem stimulovaný glukózový metabolismus byla prokázána injikováním orexinu  $\beta$ 2-AR-KO myším, na které orexin neměl vliv (Shiuchi, Haque et al. 2009).  $\beta$ 1-AR inhibice však na metabolismus glukózy žádný vliv neměla (Shiuchi, Haque et al. 2009). Orexin také vede ke zrychlení přeměny NA ve svalech, za tím však stojí jiná, než  $\beta$ 2-AR signalizace (Shiuchi, Haque et al. 2009).

Souhrnem lze říci, že správná orexinová signalizace by mohla mít významnou roli v boji proti DIO a diabetu, neboť jeho působení vede ke zvyšování metabolismu po příjmu potravy a pozitivně ovlivňuje správné fungování insulinu a glukózový metabolismus.

### 4.3 Regulace pomocí SNS

#### 4.3.1 Dopad sympatektomie na kosterní sval

Až v roce 1981 se ukázalo, že sympatická inervace v kosterním svalu není omezena pouze na cévy, ale pravděpodobně reguluje přímo svalová vlákna (Barker and Saito 1981). SNS je důležitým regulátorem funkce i morfologie kosterního svalu a jeho inervace, má vliv na transkriptom kosterního svalu, fosforylaci axonálních neurofilament, tloušťku myelinu, zastoupení typu myovláken a expresi acetylcholinových receptorů (**AChR**) na postsynaptické části NMJ a tedy i motorickou inervaci svalů (Rodrigues, Messi et al. 2019).

Pomocí sympatektomie byla prokázána klíčová role sympatického nervového systému (**SNS**) na kosterní sval. SNS hraje klíčovou roli v regulaci přenosu signálu na NMJ a na svalovou sílu. Ablace SNS má podobný dopad jako motorická denervace, dochází k expresi genů spojených s motorickou denervací, k poklesu inervace svalů (prokázáno barvením proti tyrosin hydroxyláze (**TH**) svalů a k úbytku svalové hmoty, na to by však mohla mít vliv i možná změna v průtoku krve způsobená denervací. Sympatektomie vedla k nižšímu dráždění motorických nervů, což svědčí o regulaci přenosu signálu na NMJ pomocí SNS. SNS reguluje i přenos vzruchu, důležitá neurofilamenta a mikrotubuly a jejich fosforylaci v motoneuronech (Hisanaga and Hirokawa 1989), stejně jako váčkový transport (Lewis and Nixon 1988). Sympatektomie vedla k defosforylaci neurofilament vedoucí k jejich dezorganizaci a ke snížení myelinizace axonů motorických neuronů (Rodrigues, Messi et al. 2019). Zdá se, že k těmto změnám dochází přeprogramováním schwannových buněk vyvolaným ablací SNS (Jessen and Mirsky 2016). K modifikaci přenosu na NMJ dochází také snížením uvolňováním acetylcholinu (**Ach**) (Searl and Silinsky 2000) a úbytkem AChR na postsynaptické membráně, k jejichž destabilizaci dochází změnou exprese genů vyvolanou ablací SNS (Rodrigues, Messi et al. 2019).

SNS reguluje expresi genů nezbytných pro svalový metabolismus a cirkadiální rytmy, protože po sympatektomii došlo ke snížení exprese těchto genů. Na expresi genů má sympatektomie podobný vliv jako svalová denervace motorických nervů, což opět vypovídá o vlivu SNS na motorické nervy (Rodrigues, Messi et al. 2019). Vliv SNS na svalovou morfologii byl prokázán na úrovni detekce typů svalových vláken: sympatektomie vedla k poklesu zastoupení pomalých

svalových vláken, zatímco procento rychlých svalových vláken bylo nezměněno, kvantifikováno na základě markerů (miR-206) (Rodrigues, Messi et al. 2019).

Souhrnem je možno říci, že SNS má důležitý význam jak na regulaci funkce svalu, tak na jeho vývoj, expresi proteinů, celkovou morfologii svalu a také jeho signalizaci. Pro výzkum vlivu SNS na sval byla klíčová především metoda sympatektomie. Ukázalo se, že ablace SNS má na sval podobný dopad jako jeho denervace motorických nervů.

#### 4.3.2 MuRF1

Vliv SNS na morfologii a inervaci kosterního svalstva je regulován mj. změnami exprese **MuRF1** (z angl. muscle RING-finger protein-1). Exprese MuRF1 vede ke svalové atrofii, k vyšší endocytóze AChR a tudíž menšímu vystavení těchto receptorů v NMJ. Ve zdravém svaly je exprese MuRF1 tlumena. Po svalové denervaci nebo sympatektomii dochází ke zvýšení jeho exprese (Delbono, Rodrigues et al. 2021). Jedním z důkazů o vlivu exprese MuRF1 na svalovou atrofii je studie Moriscot a kol, kteří ukázali, že u MuRF1-KO nedochází k denervaci indukované atrofii. (Moriscot, Baptista et al. 2010).

#### 4.3.3 Adrenergní signalizace

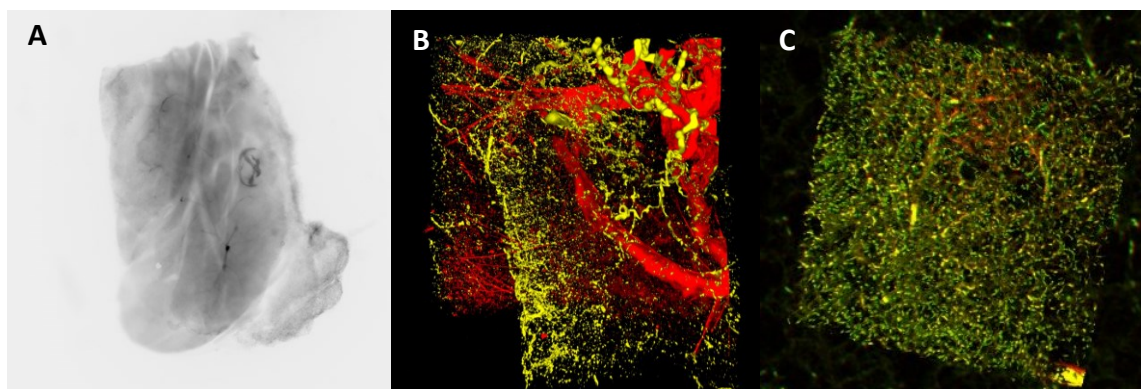
Další možnost regulace svalu pomocí SNS spočívá v AR signalizaci. V kosterních svalech se nacházejí  $\beta$ 1- a  $\beta$ 2-AR, které jsou klíčové pro působení SNS pomocí NA a adrenalinu.  $\beta$ 2-AR souvisí přímo s regulací svalového metabolismu a udržováním svalové hmoty (Lynch and Ryall 2008).  $\beta$ 2-AR agonisté působí na zvýšení syntézy proteinů v denervovaném svaly a potlačují proteolýzu po zranění (Navegantes, Baviera et al. 2009; Gonçalves, Silveira et al. 2012). Depolarizace sympatického axonu vede k uvolnění NA, ten pak působí na  $\beta$ -AR sympatického nervu, ale také na  $\beta$ -AR motorického nervu a  $\beta$ 2-AR svalového vlákna. Exprese  $\beta$ -AR se snižuje s věkem. NA působí na motoneuron také přes **TRPV1** (z angl. transient receptor potential vanilloid1) a **P/Q-VGCC** (z angl. P/Q type of voltage-gated calcium channel) kanály, které po interakci s NA vpouštějí  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky neuronu. Zvýšený cytoplasmatický  $\text{Ca}^{2+}$  vede k tvorbě a uvolňování Ach na NMJ (Delbono, Rodrigues et al. 2021).

#### 4.4 Metody pro kvantifikaci sympatické inervace v tkáni

Míra a regulace inervace tkáně se dá detekovat pomocí několika metod, nicméně pro studium termogeneze je klíčová především detekce sympatické inervace v termogenních tkáních, tedy svaly a BAT. Pro procesy klíčové k aktivaci termogeneze je klíčové působení NA na  $\beta$ -AR.

Vnitřní struktura tkáně včetně její inervace se studují typicky pomocí histologických metod. Histologické zobrazení pomocí tenkých řezů však přináší nevýhodu a možné zkreslení výsledků v tom, že pomocí nich nedokážeme detekovat celé struktury a jejich zastoupení v tkáni. Na řezech vidíme pouze 2D řezy danou strukturou a to nám neumožňuje získat dokonalou představu o celkové morfologii tkáně. K lepšímu poznání nám může pomoci 3D zobrazování, pomocí něhož můžeme zobrazit celý kus tkáně. 3D zobrazování lze např. provádět (a) pomocí optické projekční tomografie, která nám však neposkytne dostatečné rozlišení pro detekci malých struktur – nervů, a někdy neumožňuje snímat fluorescenční značení cílových struktur (obr. 5A), (b) pomocí tzv. „lightsheet“ mikroskopu, který nám dá informaci o fluorescenčním značení cílových struktur, ale rozlišení není dostatečné pro detekci velmi tenkých nervových vláken (obr. 5B), nebo (c) pomocí dvoufotonového excitačního mikroskopu, který nám poskytne jak informaci o fluorescenčním barvení cílových struktur, tak dokáže detekovat i dostatečně malé struktury, jako jsou malé nervy, jeho nevýhodou je však omezení velikosti vzorku (obr. 5C). Pro pochopení řízení termoregulace v rámci celého těla nám může pomoci detekce SNS v termogenních tkáních, např. pomocí imunofluorescenčního barvení proti TH, která je limitujícím enzymem syntézy NA, produkovaného na zakončení sympatických svalových vláken, a detekce krevního zásobení tkáně pomocí barvení proti isolectinu, umožňující zobrazení cév. Na rozdíl od svalů je BAT, stejně jako další na lipidy bohaté tkáně, problematická pro 3D zobrazování, neboť vysoká denzita lipidů v podobě lipidových kapének uvnitř těchto tkání způsobuje lom světelných paprsků na rozhraní voda/tuková kapénka a to nám brání v získání silnějšího optického řezu. Toto lze řešit metodou clearování, kdy se lipidy z tkáně odstraní pomocí kombinace organických rozpouštědel, ale její struktura zůstává zachována. Metoda clearování se dá použít na všechny tkáně těla a jejím cílem je vyrovnat indexy lomu jednotlivých složek tkáně a tím umožnit co nejpreciznější zobrazení. Existuje množství protokolů (přehled např. v (Yu, Qi et al. 2018)), jak toho dosáhnout, pro tukovou tkáň je vhodná Adipoclear metoda (popsaná v (Chi, Crane et al. 2018)).





**Obr. 5: Možnosti 3D zobrazení hnědé tukové tkáně po imunohistochemické detekci kapilár (použito barvení pomocí isolectinu GS-IB4 a vláken sympatiku (použito barvení pomocí protilátky proti TH a její fluorescenční detekce pomocí sekundární protilátky Donkey Anti-Sheep IgG H &L). Tkáň byla clearovaná pomocí metody Adipoclear. Celý proces začíná fixací v paraformaldehydu, během kterého dochází k fixaci proteinů tvorbou S-S můstků. Před samotnou delipidizací je potřeba tkáň dehydratovat v methanolové řadě spolu s pufrem obsahujícím detergent (Triton X-100). Delipidizace probíhá inkubací v rozpouštědle dichlormethanu. Pro vyrovnání indexu lomu jsou vzorky inkubovány v dibenzyl etheru. Takto upravená tkáň se dá barvit rutinními imunohistochemickými metodami. (Richardson, Guan et al. 2021)); A) snímek z optické projekční tomografie Milano, použitý objektiv: EO PLAN APO ELWD 2x; B) snímek z „lightsheet“ mikroskopu (Leica Stellaris 8 Digital LightSheet microscope), použité objektivy: iluminační L 1.6 /0.05 DLS, detekční HC FLUOTAR L 16x/0.6 IMM CORR DLS; C) snímek z dvoufotonového excitačního mikroskopu (Bruker Ultima IntraVital).**

## 5 Závěr

Předložená práce diskutuje savčí termogenezi, včetně jejího evolučního vývoje. Důraz je kladen na problematiku svalové NST. V práci jsou probírány různé vlivy, mající účinek na nástup a efektivnost NST, a to jak vlivy vnitřní (fyziologické, metabolické, vývojové), tak vnější. Diskutován je také mechanismus svalové NST, proteiny, které jsou za tento proces zodpovědné, změny v jejich expresi a faktory tyto změny a procesy ovlivňující.

Centrálně je termogeneze řízena na úrovni hypotalamu, práce toto propojuje s problematikou řízení příjmu potravy a s regulací vasokonstrikce. Je zde tedy ukázána souvislost mezi řízením svalové NST a faktory, které vedou k metabolickému syndromu. Vývoj svalu je z velké míry regulován také SNS, poruchy tohoto vývoje mají negativní dopad vedoucí ke ztrátám regulace svalu a exprese jeho proteinů, mohou mít tedy vliv i na schopnost svalové NST a v konečném důsledku na celotělový metabolismus, což souvisí s rozvojem metabolického syndromu.

Práce propojuje téma svalové NST s problematikou metabolického obratu a naznačuje případnou propojenost tohoto tématu s možnostmi léčby obezity a metabolického syndromu.



## 6 Seznam literatury

\* označena review

Albers, P. H., A. J. T. Pedersen, J. B. Birk, D. E. Kristensen, B. F. Vind, O. Baba, J. Nøhr, K. Højlund and J. F. P. Wojtaszewski (2014). "Human Muscle Fiber Type–Specific Insulin Signaling: Impact of Obesity and Type 2 Diabetes." Diabetes **64**(2): 485-497.

\* Astrup, A. V., N. J. Christensen, L. Simonsen and J. Bülow (1990). "Effects of nutrient intake on sympathoadrenal activity and thermogenic mechanisms." J Neurosci Methods **34**(1-3): 187-192.

Babu, G. J., P. Bhupathy, C. A. Carnes, G. E. Billman and M. Periasamy (2007). "Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology." J Mol Cell Cardiol **43**(2): 215-222.

Bal, N. C., S. C. Gupta, M. Pant, D. H. Sopariwala, G. Gonzalez-Escobedo, J. Turner, J. S. Gunn, C. R. Pierson, S. Q. Harper, J. A. Rafael-Fortney, M. Periasamy. Is Upregulation of Sarcolipin Beneficial or Detrimental to Muscle Function? Front Physiol **12**: 633058.

Bal, N. C., S. K. Maurya, S. Singh, X. H. Wehrens and M. Periasamy (2016). "Increased Reliance on Muscle-based Thermogenesis upon Acute Minimization of Brown Adipose Tissue Function." J Biol Chem **291**(33): 17247-17257.

Bal, N. C., S. K. Maurya, D. H. Sopariwala, S. K. Sahoo, S. C. Gupta, S. A. Shaikh, M. Pant, L. A. Rowland, E. Bombardier, S. A. Goonasekera, A. R. Tupling, J. D. Molkenstin and M. Periasamy (2012). "Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals." Nat Med **18**(10): 1575-1579.

\* Bal, N. C. and M. Periasamy (2020). "Uncoupling of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase pump activity by sarcolipin as the basis for muscle non-shivering thermogenesis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **375**(1793): 20190135.

Bal, N. C., S. K. Sahoo, S. K. Maurya and M. Periasamy (2018). "The Role of Sarcolipin in Muscle Non-shivering Thermogenesis." Front Physiol **9**: 1217.

Baldwin, K. M., D. R. Joannisse, F. Haddad, R. L. Goldsmith, D. Gallagher, K. H. Pavlovich, E. L. Shamoon, R. L. Leibel and M. Rosenbaum (2011). "Effects of weight loss and leptin on skeletal muscle in human subjects." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(5): R1259-1266.

\* Bardova, K., P. Janovska, **A. Vavrova**, J. Kopecky, P. Zouhar (2024). "Adaptive induction of nonshivering thermogenesis in muscle rather than brown fat could counteract obesity." Physiological Research. *in press*

Barker, D. and M. Saito (1981). "Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle." Proc R Soc Lond B Biol Sci **212**(1188): 317-332.

\* Bhupathy, P., G. J. Babu and M. Periasamy (2007). "Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase." J Mol Cell Cardiol **42**(5): 903-911.

\* Bicudo, J. E. P. W., C. R. Vianna and J. G. Chaui-Berlinck (2001). "Thermogenesis in Birds." Bioscience Reports **21**(2): 181-188.

Block, B. A., J. O'Brien and G. Meissner (1994). "Characterization of the sarcoplasmic reticulum proteins in the thermogenic muscles of fish." Journal of Cell Biology **127**(5): 1275-1287.

- Blondin, D. P., A. Daoud, T. Taylor, H. C. Tingelstad, V. Bezaire, D. Richard, A. C. Carpentier, A. W. Taylor, M. E. Harper, C. Aguer and F. Haman (2017). "Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue." J Physiol **595**(6): 2099-2113.
- Bombardier, E., I. C. Smith, D. Gamu, V. A. Fajardo, C. Vigna, R. A. Sayer, S. C. Gupta, N. C. Bal, M. Periasamy and A. R. Tupling (2013). "Sarcolipin trumps  $\beta$ -adrenergic receptor signaling as the favored mechanism for muscle-based diet-induced thermogenesis." Faseb j **27**(9): 3871-3878.
- \* Brownstein, A. J., M. Veliova, R. Acin-Perez, M. Liesa, O. S. Shirihai (2022). "ATP-consuming futile cycles as energy dissipating mechanisms to counteract obesity." Rev Endocr Metab Disord **23**(1): 121-131.
- Camera, D. M., J. G. Burniston, M. A. Pogson, W. J. Smiles and J. A. Hawley (2017). "Dynamic proteome profiling of individual proteins in human skeletal muscle after a high-fat diet and resistance exercise." Faseb j **31**(12): 5478-5494.
- \* Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev. **84**(1): 277-359.
- Clarke, R. J., M. Catauro, H. H. Rasmussen and H.-J. Apell (2013). "Quantitative calculation of the role of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in thermogenesis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1827**(10): 1205-1212.
- \* Cooke, R. (2011). "The role of the myosin ATPase activity in adaptive thermogenesis by skeletal muscle." Biophys.Rev. **3**(1): 33-45.
- Costanzo, J. P. and R. E. Lee Jr. (1993). "Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*." Canadian Journal of Zoology **71**(1): 71-75.
- de Meis, L. (2001). "Uncoupled ATPase Activity and Heat Production by the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: REGULATION BY ADP\*." Journal of Biological Chemistry **276**(27): 25078-25087.
- \* de Meis, L., A. P. Arruda and D. P. Carvalho (2005). "Role of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Thermogenesis." Bioscience Reports **25**(3-4): 181-190.
- \* Delbono, O., A. C. Z. Rodrigues, H. J. Bonilla and M. L. Messi (2021). "The emerging role of the sympathetic nervous system in skeletal muscle motor innervation and sarcopenia." Ageing Res Rev **67**: 101305.
- \* Demine, S., P. Renard and T. Arnould (2019). "Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases." Cells **8**(8): 795.
- Diamond, P., L. Brondel and J. LeBlanc (1985). "Palatability and postprandial thermogenesis in dogs." Am J Physiol **248**(1 Pt 1): E75-79.
- Díaz-Vegas, A. R., A. Cordova, D. Valladares, P. Llanos, C. Hidalgo, G. Gherardi, D. De Stefani, C. Mammucari, R. Rizzuto, A. Contreras-Ferrat and E. Jaimovich (2018). "Mitochondrial Calcium Increase Induced by RyR1 and IP3R Channel Activation After Membrane Depolarization Regulates Skeletal Muscle Metabolism." Front Physiol **9**: 791.
- Dumonteil, E., H. Barré and G. Meissner (1995). "Expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport proteins in cold-acclimating ducklings." Am J Physiol **269**(4 Pt 1): C955-960.
- Dunbar, J. C., Y. Hu and H. Lu (1997). "Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats." Diabetes **46**(12): 2040-2043.

- Fajardo, V. A., E. Bombardier, C. Vigna, T. Devji, D. Bloemberg, D. Gamu, A. O. Gramolini, J. Quadrilatero and A. R. Tupling (2013). "Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers." *PLoS One* **8** (12): e84304.
- Fritsches, K. A., R. W. Brill and E. J. Warrant (2005). "Warm Eyes Provide Superior Vision in Swordfishes." *Current Biology* **15**(1): 55-58.
- Furudono, Y., C. Ando, C. Yamamoto, M. Kobashi and T. Yamamoto (2006). "Involvement of specific orexigenic neuropeptides in sweetener-induced overconsumption in rats." *Behav Brain Res* **175**(2): 241-248.
- Golozoubova, V., E. Hohtola, A. Matthias, A. Jacobsson, B. Cannon and J. Nedergaard (2001). "Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold." *Faseb Journal* **15**(11): 2048-2050.
- Gonçalves, D. A., W. A. Silveira, E. C. Lira, F. A. Graça, S. Paula-Gomes, N. M. Zanon, I. C. Kettelhut and L. C. Navegantes (2012). "Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(1): E123-133.
- \* Grigg, G. C., L. A. Beard and M. L. Augee (2004). "The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds." *Physiol Biochem Zool* **77**(6): 982-997.
- Haque, M. S., Y. Minokoshi, M. Hamai, M. Iwai, M. Horiuchi and T. Shimazu (1999). "Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats." *Diabetes* **48**(9): 1706-1712.
- Harris, G. C., M. Wimmer and G. Aston-Jones (2005). "A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking." *Nature* **437**(7058): 556-559.
- Hisanaga, S. and N. Hirokawa (1989). "The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament." *J Neurosci* **9**(3): 959-966.
- \* Hodges, G. J., D. N. Jackson, L. Mattar, J. M. Johnson and J. K. Shoemaker (2009). "Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**(3): R546-555.
- Horvath, T. L., C. H. Warden, M. Hajos, A. Lombardi, F. Goglia and S. Diano (1999). "Brain uncoupling protein 2: Uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers." *Journal of Neuroscience* **19**(23): 10417-10427.
- Chi, J., A. Crane, Z. Wu and P. Cohen (2018). "Adipo-Clear: A Tissue Clearing Method for Three-Dimensional Imaging of Adipose Tissue." *J Vis Exp* (137): 58271.
- Chinet, A. (1993). "Ca<sup>2+</sup>-dependent heat production by rat skeletal muscle in hypertonic media depends on Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transport stimulation." *J Physiol* **461**: 689-703.
- Ikeda, K., Q. Kang, T. Yoneshiro, J. P. Camporez, H. Maki, M. Homma, K. Shinoda, Y. Chen, X. Lu, P. Maretich, K. Tajima, K. M. Ajuwon, T. Soga and S. Kajimura (2017). "UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis." *Nat Med* **23**(12): 1454-1465.
- \* Jessen, K. R. and R. Mirsky (2016). "The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves." *J Physiol* **594**(13): 3521-3531.
- Kamohara, S., R. Burcelin, J. L. Halaas, J. M. Friedman and M. J. Charron (1997). "Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment." *Nature* **389**(6649): 374-377.

- Kaufman, L. N., J. B. Young and L. Landsberg (1986). "Effect of protein on sympathetic nervous system activity in the rat. Evidence for nutrient-specific responses." J Clin Invest **77**(2): 551-558.
- Kuznetsov, A. V., V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter and W. S. Kunz (2008). "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells." Nature Protocols **3**(6): 965-976.
- \* Landsberg, L. (1986). "Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis." Q J Med **61**(236): 1081-1090.
- \* Landsberg, L. (2006). "Feast or famine: the sympathetic nervous system response to nutrient intake." Cell Mol Neurobiol **26**(4-6): 497-508.
- Landsberg, L. and J. B. Young (1985). "Insulin-mediated glucose metabolism in the relationship between dietary intake and sympathetic nervous system activity." Int J Obes **9** Suppl 2: 63-68.
- LeBlanc, J. and L. Brondel (1985). "Role of palatability on meal-induced thermogenesis in human subjects." Am J Physiol **248**(3 Pt 1): E333-336.
- Lewis, S. E. and R. A. Nixon (1988). "Multiple phosphorylated variants of the high molecular mass subunit of neurofilaments in axons of retinal cell neurons: characterization and evidence for their differential association with stationary and moving neurofilaments." J Cell Biol **107**(6 Pt 2): 2689-2701.
- Lin, J., C. Cao, C. Tao, R. Ye, M. Dong, Q. Zheng, C. Wang, X. Jiang, G. Qin, C. Yan, K. Li, J. R. Speakman, Y. Wang, W. Jin and J. Zhao (2017). "Cold adaptation in pigs depends on UCP3 in beige adipocytes." Journal of Molecular Cell Biology **9**(5): 364-375.
- \* Lynch, G. S. and J. G. Ryall (2008). "Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease." Physiol Rev **88**(2): 729-767.
- Maurya, S. K., N. C. Bal, D. H. Sopariwala, M. Pant, L. A. Rowland, S. A. Shaikh and M. Periasamy (2015). "Sarcolipin Is a Key Determinant of the Basal Metabolic Rate, and Its Overexpression Enhances Energy Expenditure and Resistance against Diet-induced Obesity." J Biol Chem **290**(17): 10840-10849.
- Maurya, S. K., J. L. Herrera, S. K. Sahoo, F. C. G. Reis, R. B. Vega, D. P. Kelly and M. Periasamy (2018). "Sarcolipin Signaling Promotes Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle." Cell Rep **24**(11): 2919-2931.
- \* Modesti, L., A. Danese, V. Angela Maria Vitto, D. Ramaccini, G. Aguiari, R. Gafà, G. Lanza, C. Giorgi and P. Pinton (2021). "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Signaling in Health, Disease and Therapy." Cells **10**(6): 1317.
- Moriscot, A. S., I. L. Baptista, J. Bogomolovas, C. Witt, S. Hirner, H. Granzier and S. Labeit (2010). "MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance." J Struct Biol **170**(2): 344-353.
- Navegantes, L. C., A. M. Baviera and I. C. Kettelhut (2009). "The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis of skeletal muscle." Braz J Med Biol Res **42**(1): 21-28.
- Nedergaard, J. and B. Cannon (2013). "UCP1 mRNA does not produce heat." Biochim Biophys Acta **1831**(5): 943-949.
- Nicol, S. C., N. A. Andersen, U. Mesch (1992). "Metabolic rate and ventilation pattern in the echidna during hibernation and arousal, in *Platypus* and *Echidnas*, ed M. L. Augée (Chipping Norton, NSW: Roy. Zool. Soc.), 150–159.

- \* Nowack, J., S. Giroud, W. Arnold and T. Ruf (2017). "Muscle Non-shivering Thermogenesis and Its Role in the Evolution of Endothermy." Front Physiol **8**: 889.
- Nowack, J., S. G. Vetter, G. Stalder, J. Painer, M. Kral, S. Smith, M. H. Le, P. Jurcevic, C. Bieber, W. Arnold and T. Ruf (2019). "Muscle nonshivering thermogenesis in a feral mammal." Sci Rep **9**(1): 6378.
- O'Hare, J. A., K. L. Minaker, G. S. Meneilly, J. W. Rowe, J. A. Pallotta and J. B. Young (1989). "Effect of insulin on plasma norepinephrine and 3, 4 -dihydroxyphenylalanine in obese men." Metabolism **38**(4): 322-329.
- Oelkrug, R., N. Goetze, C. Exner, Y. Lee, G. K. Ganjam, M. Kutschke, S. Muller, S. Stohr, M. H. Tschop, P. G. Crichton, G. Heldmaier, M. Jastroch and C. W. Meyer (2013). "Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution." Nat Commun **4**: 2140.
- Oelkrug, R., G. Heldmaier and C. W. Meyer (2011). "Torpor patterns, arousal rates, and temporal organization of torpor entry in wildtype and UCP1-ablated mice." J Comp Physiol B **181**(1): 137-145.
- \* Oliver, S. R., K. J. Anderson, M. M. Hunstiger and M. T. Andrews (2019). "Turning down the heat: Down-regulation of sarcolipin in a hibernating mammal." Neuroscience Letters **696**: 13-19.
- Pant, M., N. C. Bal and M. Periasamy (2015). "Cold adaptation overrides developmental regulation of sarcolipin expression in mice skeletal muscle: SOS for muscle-based thermogenesis?" J Exp Biol **218**(Pt 15): 2321-2325.
- Passatore, M. and S. Roatta (2006). "Influence of sympathetic nervous system on sensorimotor function: whiplash associated disorders (WAD) as a model." Eur J Appl Physiol **98**(5): 423-449.
- \* Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve **35**(4): 430-442.
- \* R R J Chaffee, a. and J. C. Roberts (1971). "Temperature Acclimation in Birds and Mammals." Annual Review of Physiology **33**(1): 155-202.
- Radovanovic, D., K. Peikert, M. Lindstrom and F. P. Domellof (2015). "Sympathetic innervation of human muscle spindles." J Anat **226**(6): 542-548.
- Raimbault, S., S. Dridi, F. Denjean, J. Lachuer, E. Couplan, F. Bouillaud, A. Bordas, C. Duchamp, M. Taouis and D. Ricquier (2001). "An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds." Biochemical Journal **353**(Pt 3): 441-444.
- Rappaport, E. B., J. B. Young and L. Landsberg (1982). "Initiation, duration and dissipation of diet-induced changes in sympathetic nervous system activity in the rat." Metabolism **31**(2): 143-146.
- \* Richardson, D. S., W. Guan, K. Matsumoto, C. Pan, K. Chung, A. Ertürk, H. R. Ueda and J. W. Lichtman (2021). "TISSUE CLEARING." Nat Rev Methods Primers **1**(1): 84.
- Rodrigues, A. C. Z., M. L. Messi, Z. M. Wang, M. C. Abba, A. Pereyra, A. Birbrair, T. Zhang, M. O'Meara, P. Kwan, E. I. S. Lopez, M. S. Willis, A. Mintz, D. C. Files, C. Furdui, R. W. Oppenheim and O. Delbono (2019). "The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability." Acta Physiol (Oxf) **225**(3): e13195.
- \* Rolfe, D. F. S. and G. C. Brown (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals." Physiological Reviews **77**(3): 731-758.

- Rothwell, N. J. and M. J. Stock (1978). "A paradox in the control of energy intake in the rat." Nature **273**(5658): 146-147.
- \* Rowland, L., N. Bal and M. Periasamy (2014). "The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy." Biological Reviews **90**(4): 1279-1297.
- Rowland, L. A., N. C. Bal, L. P. Kozak and M. Periasamy (2015). "Uncoupling Protein 1 and Sarcolipin Are Required to Maintain Optimal Thermogenesis, and Loss of Both Systems Compromises Survival of Mice under Cold Stress." J Biol Chem **290**(19): 12282-12289.
- Sahoo, S. K., S. A. Shaikh, D. H. Sopariwala, N. C. Bal and M. Periasamy (2013). "Sarcolipin Protein Interaction with Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>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.
- Sakurai, M., T. Takamura, T. Ota, H. Ando, H. Akahori, K. Kaji, M. Sasaki, Y. Nakanuma, K. Miura and S. Kaneko (2007). "Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." Journal of Gastroenterology **42**(4): 312-317.
- Searl, T. J. and E. M. Silinsky (2000). "The phosphatidylinositol 4-kinase inhibitor phenylarsine oxide blocks evoked neurotransmitter release by reducing calcium entry through N-type calcium channels." Br J Pharmacol **130**(2): 418-424.
- \* Serrano, N., J. K. Hyatt, J. A. Houmard, M. Murgia and C. S. Katsanos (2023). "Muscle fiber phenotype: a culprit of abnormal metabolism and function in skeletal muscle of humans with obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab **325**(6): E723-E733.
- Shiuchi, T., M. S. Haque, S. Okamoto, T. Inoue, H. Kageyama, S. Lee, C. Toda, A. Suzuki, E. S. Bachman, Y. B. Kim, T. Sakurai, M. Yanagisawa, S. Shioda, K. Imoto and Y. Minokoshi (2009). "Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system." Cell Metab **10**(6): 466-480.
- Schulte, L., D. Peters, J. Taylor, J. Navarro and S. Kandarian (1994). "Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump expression in denervated skeletal muscle." Am J Physiol **267**(2 Pt 1): C617-622.
- Schwartz, J. H., J. B. Young and L. Landsberg (1983). "Effect of dietary fat on sympathetic nervous system activity in the rat." J Clin Invest **72**(1): 361-370.
- Schwartzman, R. J. and J. Kerrigan (1990). "The movement disorder of reflex sympathetic dystrophy." Neurology **40**(1): 57-61.
- Sumbilla, C., M. Cavagna, L. Zhong, H. Ma, D. Lewis, I. Farrance and G. Inesi (1999). "Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes." Am J Physiol **277**(6): H2381-2391.
- Tattersall, G. J., C. A. C. Leite, C. E. Sanders, V. Cadena, D. V. Andrade, A. S. Abe and W. K. Milsom (2016). "Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards." Science Advances (1): e1500951.
- Tucker, J. M., L. A. Tucker, J. Lecheminant and B. Bailey (2013). "Obesity increases risk of declining physical activity over time in women: a prospective cohort study." Obesity (Silver Spring) **21**(12): E715-720.
- Wade, A. J., M. M. Marbut and J. M. Round (1990). "Muscle fibre type and aetiology of obesity." Lancet **335**(8693): 805-808.
- Young, J. B. (1988). "Effect of experimental hyperinsulinemia on sympathetic nervous system activity in the rat." Life Sci **43**(2): 193-200.

Young, J. B. and L. Landsberg (1977). "Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding." Nature **269**(5629): 615-617.

Young, J. B., E. Saville, N. J. Rothwell, M. J. Stock and L. Landsberg (1982). "Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat." J Clin Invest **69**(5): 1061-1071.

\* Yu, T., Y. Qi, H. Gong, Q. Luo and D. Zhu (2018). "Optical clearing for multiscale biological tissues." J Biophotonics **11**(2).