

UNIVERZITA KARLOVA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Ústav hygieny a preventivní medicíny

Obezita a obezogeny

Obesity and obesogens



Disertační práce

Vypracovala: Mgr. Jana Dvořáková

Školitel: doc. MUDr. Dana Müllerová, Ph.D.

Školitel konzultant: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.

Studijní program: Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie

Plzeň 2019

Poděkování

Mé poděkování patří především školitelce doc. MUDr. Daně Müllerové, Ph.D. za vedení v rámci studia.

Dále bych ráda poděkovala své konzultantce MUDr. Miroslavě Čedíkové, Ph.D. za ochotu a trpělivost, se kterou mi pomáhala při kultivacích a pokusech s adipocyty, a za cenné připomínky a praktické rady v průběhu celého studia a při přípravě disertační práce.

Velký dík patří všem kolegům, jmenovitě doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D., doc. RNDr. Martinovi Peštovi, Ph.D., MUDr. Vlastimilovi Kuldovi, Ph.D., Ing. Michaele Kripnerové, se kterými jsem spolupracovala na grantu IGA (NT 14330-3/2013 „Polychlorované perzistentní organické polutanty v etiopatogenezi obezity a inzulinové rezistence“), v jehož rámci moje disertační práce vznikala, za cennou pomoc při zpracování vzorků a vyhodnocení a publikování dat.

V neposlední řadě bych chtěla rovněž poděkovat doc. MUDr. Mgr. Zbyňkovi Tonarovi, Ph.D. a MUDr. Anně Malečkové za poskytnutí fotografií histologických preparátů tukové tkáně, a výtvarnici Lence Jetlebové za pomoc při vytváření ilustrací.

Mgr. Jana Dvořáková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a veškeré převzaté údaje řádně citovala. V textové části jsou použity části předchozích článků, kde jsem spoluautorem, a jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce.

Souhlasím s uložením elektronické verze své práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni dne

Mgr. Jana Dvořáková

.....

Abstrakt

Výskyt obezity již dosahuje epidemických rozměrů. Jako hlavní příčina bylo kromě nadměrného příjmu potravin a nedostatku fyzické aktivity identifikováno genetické pozadí a v poslední době i tzv. obezogeny. Tyto látky poškozují metabolické procesy, zasahují do hormonálních funkcí a narušují energetickou rovnováhu ve prospěch přibírání na hmotnosti a vzniku obezity.

Teoretická část této práce se zabývá obezitou, tukovou tkání, tukovou kapénkou a obezogeny. Z obezogenů je více rozebrána skupina perzistentních organických polutantů, z níž byl jeden zástupce použit v praktické části této práce.

Cílem praktické části bylo popsat buněčný model diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk do adipocytů a následně zkoumat vliv jednoho z nejčastěji se vyskytujících obezogenů na expresi genů lipidového metabolismu a genů insulinové signální dráhy.

U buněk byly v průběhu diferenciaci sledovány morfologické změny (ve dnech 0, 4, 10 a 21). Mesenchymální buňky protáhlého vřetenovitého tvaru se mění na adipocyty vyplněné tukovými kapénkami. Pro kvantifikaci akumulovaných lipidů bylo použito barvení Oil Red O. Diferenciaci v adipocyty byla potvrzena fluorescenční imunocytochemií za použití specifického proteinu FABP4. Viabilita buněk byla stanovována pomocí metody PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. V průběhu diferenciaci nebyly pozorovány signifikantní změny v buněčné viabilitě.

V průběhu diferenciaci byly adipocyty vystaveny účinkům látky ze skupiny perzistentních organických polutantů (POP), a to DDE. Přidání lipidů do diferenciacního média simulující nutričně toxické prostředí statisticky významně snížilo u diferencujících se adipocytů expresi genů regulujících adipogenezi (OCT4, PPARG a PPARGC1B). Expozice DDE statisticky významně zvýšila expresi genů lipidového metabolismu a insulinové signální dráhy (INSR, AKT2, ACLY, LIPE a FASN) oproti diferenciacnímu médiu s přidanými lipidy.

Tato práce tak potvrzuje, že POP nejsou v tukové tkáni jen pasivně uloženy, ale že narušují metabolické funkce. Mohou tak hrát významnou roli v rozvoji obezity a jejích komplikací.

Klíčová slova: tuková kapénka, tuková tkáň, obezita, obezogeny, DDE, mesenchymální kmenové buňky, adipocyty

Abstract

The prevalence of obesity has already epidemic dimensions. Recently, the obesogens have been identified as the main cause in addition to excessive food intake, the lack of physical activity and the genetic background. These substances damage the metabolic processes, interfere with the hormonal functions and impair the energy balance in behalf of gaining weight and obesity.

The theoretical part of this work deals with obesity, adipose tissue, lipid droplet and obesogens. From the obesogens there is closely specified a group of persistent organic pollutants (POP) from which one representative was used in the practical part of this work.

The aim of the practical part was to describe the cellular model of differentiation the mesenchymal stem cell into adipocytes and to investigate the effect of one of the most frequently occurring obesogen on the expression genes of lipid metabolism and insulin signalling pathway.

The morphological changes were observed in cells during differentiation (at days 0, 4, 10 and 21). The mesenchymal cells of the elongated spindle shape changed into adipocytes filled with lipid droplets. Oil Red O staining was used for quantification of accumulated lipids. The differentiation to adipocytes was confirmed by fluorescence immunocytochemistry using a specific protein FABP4. The cell viability was determined by using the PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. During the differentiation there were not observed any significant changes in the cellular viability.

During the differentiation, the adipocytes were exposed to the effect of the substance from the group of persistent organic pollutants, nominally DDE. The addition of lipids to the differentiation medium simulating nutritionally toxic environment reduced significantly the expression of genes regulating adipogenesis (OCT4, PPARG and PPARGC1B) by differentiating adipocytes. The exposure of DDE significantly increased the expression of genes of lipid metabolisms and the insulin signalling pathway (INSR, AKT2, ACLY, LIPE and FASN) compared to the differentiation medium with added lipids.

This work confirms that POP are not only passively stored in the adipose tissue but what is more they can impair metabolic functions. They can have an important role in the development of obesity and it's complications.

Key words: lipid droplet, adipose tissue, obesity, obesogens, DDE, mesenchymal stem cells, adipocytes

Obsah

1	ÚVOD	9
1.1	Obezita	10
1.1.1	Definice a prevalence obezity	10
1.1.2	Etiologie obezity	10
1.1.3	Klasifikace hmotnosti člověka	11
1.1.4	Fenotypy obezity	13
1.1.5	Patofyziologie obezity, zánět v tukové tkáni	14
1.1.6	Komplikace obezity	15
1.1.7	Možnosti řešení problému obezity	18
1.2	Tuková tkáň	19
1.2.1	Histologie tukové tkáně	19
1.2.2	Fyziologie tukové tkáně	19
1.2.3	Typy tukové tkáně	21
1.2.4	Role mitochondrie v adipocytu	23
1.3	Tuková kapénka	25
1.3.1	Struktura tukové kapénky	28
1.3.2	Biogeneze tukové kapénky	29
1.3.3	Růst tukové kapénky	30
1.3.4	Rozpad a zánik tukové kapénky	31
1.3.5	Skupina PAT proteinů	32
1.3.6	Funkce tukových kapének	35
1.3.7	Patologické stavy spojené s tukovými kapénkami	36
1.4	Obezogeny	38
1.4.1	Hypotéza obezogenů	38
1.4.2	Přehled známých a pravděpodobných obezogenů (endokrinních disruptorů)	38
1.4.3	Perzistentní organické polutanty (POP)	42
2	HLAVNÍ A DÍLČÍ CÍLE	49
3	MATERIÁL A METODIKA	50
3.1	Mesenchymální kmenové buňky	50
3.2	Kultivace mesenchymálních kmenových buněk	50
3.3	Diferenciace mesenchymálních kmenových buněk v adipocyt	50
3.4	Fotodokumentace průběhu diferenciace	51
3.5	Barvení Oil Red O	51
3.6	Kvantifikace akumulovaných lipidů	51
3.7	Fluorescenční imunocytochemie	51
3.8	Viabilita buněk	52
3.9	Distribuce mitochondrií v buňce	52
3.10	Mitochondriální membránový potenciál	53
3.11	Ovlivnění adipocytů v průběhu jejich diferenciace vybranými polutanty	54
3.12	Kvantitativní stanovení exprese mRNA vybraných genů pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR)	56
3.13	Statistické vyhodnocení	58
4	SOUHRN VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE	59
4.1	Výsledky a diskuze vztahující se k cíli 1	59
4.2	Výsledky a diskuze vztahující se k cíli 2	72

5 ZÁVĚRY.....	80
5.1 Závěry vztahující se k cíli 1	80
5.2 Závěry vztahující se k cíli 2	81
5.3 Závěry pro praxi a výhled do budoucna	82
Seznam použité literatury	83
Seznam obrázků.....	99
Seznam tabulek	100
Seznam příloh	101

Seznam použitých zkratek a symbolů

ACLY	ATP citrát lyáza
acyl-CoA	acylkoenzym A
ADRP	adipofilin (z angl. adipose differentiation-related protein; PLIN2, perilipin 2)
AKT2	AKT serin/threonin kináza 2
bAT	běžová tuková tkáň (z angl. beige adipose tissue)
BAT	hnědá tuková tkáň (z angl. brown adipose tissue)
BMI	Body Mass Index
CIDE	skupina proteinů navozujících buněčnou smrt a fragmentaci DNA v savcích buňkách (z angl. cell death-inducing DFF45-like effector)
DDE	dichlordifenylchloroethylen (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethylen)
DDT	dichlordifenyltrichlorethan (trichloro-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan)
DM2T	diabetes mellitus 2. typu
ER	endoplazmatické retikulum
FABP4	člen skupiny proteinů vázajících mastné kyseliny (z angl. fatty acid binding protein 4)
FASN	syntáza mastných kyselin
hADMSCs	lidské mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně
INSR	insulinový receptor
LIPE	hormon-senzitivní lipáza (HSL)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate buffered saline)
PCB	polychlorované bifenyly
PLIN1	perilipin 1 (PLIN1), člen skupiny PAT proteinů
PLIN2	perilipin 2 (ADRP, adipofilin, z angl. adipose differentiation-related protein)
POP	perzistentní organické polutanty
PPARA	alfa receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem
PPARG	gamma receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. real-time polymerase chain reaction)
TG	triacylglyceroly
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (z angl. tumor necrosis factor α)
WAT	bílá tuková tkáň (z angl. white adipose tissue)
WHO	Světová zdravotnická organizace
WHR	poměr pasu a boků (z angl. waist-hip ratio)

1 ÚVOD

V současnosti trpí obezitou či nadváhou téměř třetina lidí ve věku vyšším než 18 let a výskyt tohoto onemocnění stále celosvětově vzrůstá, přestože se jedná o onemocnění preventabilní. Alarmující je, že jeho prevalence prudce stoupá nejen u dospělých, ale i u dětí.

Nadváhu a obezitu definujeme jako nadměrné nebo abnormální ukládání tuku, které negativně ovlivňuje zdraví jedince. Za hlavní příčiny nárůstu obezity a metabolických onemocnění se v současné době považuje obezigenní životní prostředí a životní styl člověka, charakterizovaný sníženou fyzickou aktivitou a nadbytkem kaloricky denzní potravy s velkým množstvím tuků a jednoduchých cukrů. K obezitě jsou často přidružena i další doprovodná onemocnění jako je např. hypertenze, dyslipidemie, hyperglykemie, insulinová rezistence a kardiovaskulární onemocnění. Toto je v klinické medicíně souhrnně označované jako kardiometabolický syndrom, který byl poprvé popsán v 80. letech 20. století profesorem Geraldem Reavenem [Abella, 2014; Ferdinand, 2014]. Na patogenezi komplikací obezity se podílí zejména sama tuková tkáň.

V současné době jsou diskutovány hypotézy o vlivu tzv. obezogenů či endokrinních disruptorů, tedy chemických látek ze zevního prostředí, které se mohou spolupodílet jak na adipogenezi, tak na metabolických poruchách. Mezi tyto látky patří i perzistentní organické polutanty (POP), které se do lidského organismu dostávají především potravou živočišného původu [Müllerová a Kopecký, 2007; Xu et al., 2013].

V posledních letech bylo prokázáno, že ke komplikacím spojených s nadváhou, obezitou a rozvojem diabetu mellitu 2. typu či kardiometabolického syndromu může vést i snižující se mitochondriální hustota a poškození mitochondriálních funkcí v různých tkáních [Heilbronn et al., 2007; De Pauw et al., 2009]. V souvislosti s tím se zkoumá vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a ukazuje se, že tyto látky mají negativní účinek na respirační parametry mitochondrií, zvyšují produkci volných kyslíkových radikálů a tak dochází k dalšímu zvyšování oxidačního stresu, ke zvýšení hladin zánětlivých cytokinů a následně vzniku prooxidativních podmínek. Vzniklé volné kyslíkové radikály pak mohou poškodit buněčné struktury a podílet se zpětně na spuštění zánětlivé reakce spojené s insulinovou rezistencí či kardiometabolickým syndromem. Jedná se tak o začarovaný kruh, kdy dochází k dalšímu nárůstu oxidačního stresu vedoucímu k dalšímu a stále se zvyšujícímu poškození organismu [Pshenichnyuk a Modelli, 2013].

1.1 Obezita

1.1.1 Definice a prevalence obezity

Horní hranice optimálního obsahu tuku v těle u dospělého muže je 20 %, u žen o něco více (z fyziologického důvodu zásob pro období těhotenství a kojení) - do 25 % tělesné hmotnosti. Obezita je onemocnění charakterizované zmnožením tukové tkáně těla nad optimální hodnotu. Tuková tkáň pak přestává plnit svoji metabolickou a endokrinní roli.

V současnosti je prokázáno, že rychlost nárůstu obezity v populaci je tak velká, že se jedná již o pandemii obezity, přičemž jsou postiženy nejen vyspělé, ale i rozvojové státy. Uvádí se, že v současné době trpí nadváhou asi jedna třetina populace a jedna třetina obezitou. Prevalence obezity u dětí je odhadována na 10 %, a jestliže je obezita přítomna již v dětství, je 60% pravděpodobnost, že jí bude člověk postižen i v dospělosti [Müllerová et al., 2014].

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je v evropském regionu 50 % lidí s nadváhou nebo obezitou, obézních je z toho kolem 20 % [WHO, 2018].

V České republice byla podle průzkumů agentury Stem/Mark v roce 2008 zjištěna prevalence obezity u dospělých mužů nad 18 let 23 %, u dospělých žen 21 %. Nadváhou trpělo dalších 41 % mužů a 28 % žen. Prevalence dětské obezity byla odhadována na 7 %. Už v roce 2002 označila WHO problém nadváhy a obezity jako šesté nejvýznamnější riziko ohrožující lidské zdraví [Müllerová et al., 2009].

V září 2014 byl regionálním výborem WHO pro Evropu přijat Akční plán výživy, který má výrazně snížit zátěž neinfekčních onemocnění souvisejících s výživou, obezitou a podvýživou zlepšením správy potravinového systému a celkové kvality stravy [WHO, 2018].

Obezita je chronické onemocnění, kterému lze předcházet, a které je jedním z největších hnacích motorů dalších onemocnění jako diabetes mellitus 2. typu (DM2T) a kardiovaskulární onemocnění. Představuje značnou sociální a ekonomickou zátěž celé společnosti [Yang et al., 2017].

1.1.2 Etiologie obezity

Mezi přijímanou a vydávanou energií je pro přežití organismu nezbytná rovnováha, tzv. energetická bilance. V případě kdy převažuje energetický výdej, dochází k hubnutí (snížování stavu energetických zásob) a snížení schopnosti organismu přizpůsobit se náročnějšímu okolnímu prostředí. Naopak převažuje-li dlouhodobě energetický příjem nad výdejem, energetické zásoby rostou, může dojít k přeplnění fyziologických rezervoárů

uskladňujících nadbytek energie. Dochází ke zvýšení množství tukové tkáně a tělesné hmotnosti, což se může projevit nadváhou až obezitou [Müllerová et al., 2009].

Vznik onemocnění obezitou má více příčin, jedná se o multifaktoriální metabolické onemocnění. Hlavní příčiny jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1 - Hlavní příčiny vzniku obezity,
upraveno dle [Hlúbik, 2005]

Biologické	<ul style="list-style-type: none"> • genetické (přítomnost tzv. úsporného genu zajišťujícího v minulosti přežití lidstva v období hladu) • hormonální (období těhotenství, menopauzy) • zdravotní (imobilizace, farmakoterapie)
Demografické	<ul style="list-style-type: none"> • věk • pohlaví (u žen větší tendence k ukládání tuku) • etnické vlivy
Environmentální	<ul style="list-style-type: none"> • stravovací zvyklosti (převaha energetického příjmu nad výdejem, konzumace vysoce kalorických potravin) • kouření • alkohol • fyzická inaktivita • expozice obezogenům
Sociální	<ul style="list-style-type: none"> • stupeň vzdělání • psychologické faktory • finanční situace

1.1.3 Klasifikace hmotnosti člověka

Abychom mohli jednotlivé stupně nadváhy a obezity specifikovat, je snaha o jednotnou klasifikaci hmotnosti člověka.

To můžeme udělat pomocí antropometrických indexů, např. podle indexu hmotnostně-výškového – Body Mass Indexu (BMI) (tabulka 2). Ten se vypočítá jako poměr tělesné hmotnosti a druhé mocniny tělesné výšky (kg/m^2). Při hodnotě BMI nad 25 se jedná o nadváhu, od hodnot BMI nad 30 již mluvíme o obezitě. Jeho hodnota je však pouze

orientační, např. sportovci některých sportovních odvětví mohou mít hodnotu BMI vyšší, protože mají vybudovanou velkou svalovou hmotu.

Tabulka 2 - Klasifikace hmotnosti podle BMI,
upraveno dle [Müllerová et al., 2014]

Klasifikace	BMI (kg/m²)
Podváha	< 18,4
Normální váha	18,5 – 24,9
Nadváha	25,0 – 29,9
Obezita 1. stupně	30,0 – 34,9
Obezita 2. stupně	35,0 – 39,9
Obezita 3. stupně	40 a více

Nejjednodušší metodou stanovení rozložení tukové tkáně v těle je měření obvodu pasu, které je objektivnějším indikátorem metabolického rizika než BMI. Za zvýšené riziko se u mužů považuje obvod pasu nad 94 cm, u žen nad 80 cm. Za vysoké riziko se u mužů uvádí obvod pasu nad 102 cm a u žen nad 94 cm.

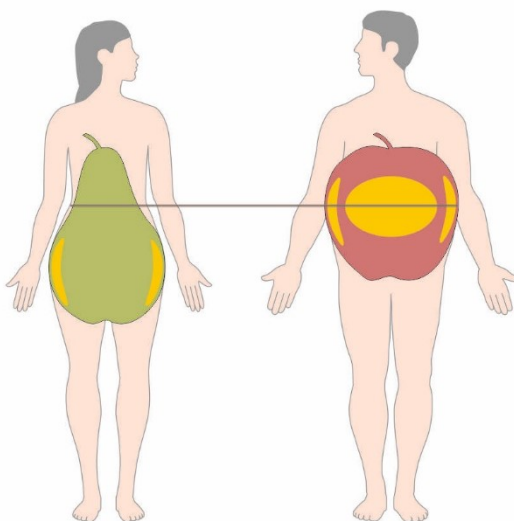
K měření a indikaci rozvoje zdravotních rizik se využívá rovněž poměr obvodu těla v pase a kolem boků (waist-hip ratio – WHR). Muži by měli mít hodnoty do 0,95 a ženy do 0,85. Hodnoty vyšší signalizují nevhodné rizikovější rozložení tuku v těle, tzv. tvar jablka (viz kapitola 1.1.4).

V současné době je upřednostňováno sledování zastoupení celkového tělesného tuku a jeho rozložení. Nejpoužívanější metodou je metoda bioelektrické impedance (BIA), která je založena na měření odporu těla procházejícímu střídavému elektrickému proudu o různých frekvencích.

Pro posouzení výživového stavu dětí se používají percentilové grafy [Müllerová et al., 2014].

1.1.4 Fenotypy obezity

Podle fenotypu můžeme obezitu rozdělit na dvě základní varianty – na androidní (centrální, tvar jablko, častější u mužů) a gynoidní (periferní, tvar hruška, častější u žen), jak je znázorněno na obrázku 1, kde jsou hlavní skladovací místa vyznačena žlutě. Vodorovná přímka značí linii pasu.



Obrázek 1 - Fenotypy obezity,
upraveno dle [Guglielmi a Sbraccia, 2018]

Bílá tuková tkáň (WAT) zahrnuje početná anatomická úložiště (viz kapitola 1.2.3). Hlavní skladovací místa se nacházejí v podkožní, břišní a gluteo-femorální oblasti. Je v nich uloženo více než 80 % celkového tělesného tuku a působí jako ochranná bariéra proti mechanickému namáhání, kožním zánětlivým procesům a jako tepelná izolace.

Struktura a rozložení bílé tukové tkáně má velký vliv na systémový metabolismus, a tudíž na riziko komplikací obezity. Intra a retroperitoneální úložiště, tzv. viscerální tuková tkáň, reprezentuje 10 – 20 % celkového tělesného tuku u mužů a 5 – 10 % u žen. Intraperitoneální tuk zahrnuje úložiště omentární (zavěšené na žaludku), mezenterické (spojené se střevem) a epiploické (podél střeva). Pak jsou ještě další početná malá viscerální tuková úložiště, která mohou sloužit specializovaným funkcím souvisejícím se sousedícími tkáněmi.

Pohlaví člověka je důležitým faktorem v projevu androidní nebo gynoidní obezity. Ženy mají vyšší obsah celkového tuku a jsou obecně efektivnější v rozdělování tuku na periferii než muži. Nicméně po menopauze je pozorován přechod ke skladovacímu vzorci jako u

mužů, s přidruženým zvýšením metabolického rizika. Tento sexuální dimorfismus se částečně vysvětluje supresivním efektem testosteronu na aktivitu lipoproteinové lipázy (LPL) a zvýšením antilipolytických $\alpha 2$ -adrenergických receptorů v gluteofemorální podkožní oblasti [Guglielmi a Sbraccia, 2018].

Pohlavní hormony nejsou pouze regulátory metabolismu adipocytů, ale také kinetiky jejich buněčných prekurzorů. Zatímco testosteron zhoršuje adipogenezi, estrogen stimuluje proliferaci preadipocytů jak v břišním podkoží, tak ve viscerální tukové tkáni a progesteron stimuluje jejich diferenciaci.

Na rozdíly v distribuci tuku má vliv také genetika, etnická příslušnost a faktory životního prostředí. S rostoucím věkem se však tělesný tuk centralizuje a přerozděluje se z podkoží do viscerálních prostor bez ohledu na pohlaví a rasu.

Zvětšení objemu adipocytů (hypertrofie), ale ne zvýšení jejich počtu (hyperplázie), je spojeno s kardiometabolickým rizikem [Guglielmi a Sbraccia, 2018]. Ve srovnání s viscerálním tukem obsahuje podkožní tuk větší množství preadipocytů, které dokonce vykazují vyšší hladiny exprese adipogenních genů a lépe reagují k diferenciacním podnětům než preadipocyty z viscerální tkáně. Akumulace tuku ve viscerálním úložišti je převážně výsledkem hypertrofie adipocytů, zatímco hyperplázie je pozorována převážně v subkutánním úložišti [Tchkonja, 2005].

Centrální (androidní) obezita (hlavně viscerální), ale také akumulace tuku v abdominální subkutánní oblasti, přináší zvýšené riziko metabolických komplikací, zatímco periferní obezita (gynoidní) s upřednostněným ukládáním tuku v oblasti gluteo-femorální je asociována s nižším rizikem a může být dokonce protektivní. V souvislosti s tím se potvrzuje, že obvod pasu a WHR jako známka centrální obezity může být větším nezávislým rizikovým faktorem pro insulinovou rezistenci, DM2T, dyslipidemii a aterosklerózu ve srovnání s BMI [Guglielmi a Sbraccia, 2018].

1.1.5 Patofyziologie obezity, zánět v tukové tkáni

Při akumulaci triacylglycerolů (TG) dochází na buněčné úrovni k nadměrnému zmnožení tukových kapének. V adipocytech pak jde o zvětšení tukové kapénky s následkem celkového zvětšení buňky (hypertrofie). Tyto hypertrofované adipocyty však nevylučují dostatek adipokinů k udržení citlivosti na insulin.

Patologii nadměrného ukládání TG mohou ovlivnit proteiny lokalizované na povrchu tukových kapének, např. FSP27/CIDEA (fat-specific protein 27) a perilipin 1 (PLIN1). FSP27/CIDEA je regulován insulinem, ovlivňuje vývoj metabolického syndromu regulací ukládání TG v adipocytech a jeho polymorfismy ovlivňují vznik obezity a insulinové rezistence. Exprese PLIN1 je rovněž důležitým faktorem asociovaným s obezitou. Chrání

kapénku před bazální lipolýzou, ale když dojde ke stimulaci lipolýzy, reguluje přístup lipáz ke kapénce. Vysoké hladiny exprese těchto proteinů podporují skladování neutrálních TG v tukové tkáni. Při metabolickém syndromu je však rezervoárová funkční kapacita tukové tkáně překročena a volné mastné kyseliny se pak hromadí v kosterním svalstvu, srdci nebo játrech. Působí zde lipotoxicky a spolupodílejí se na rozvoji metabolického syndromu s insulinovou rezistencí [Krahmer et al., 2013].

WAT vylučuje četné bioaktivní molekuly, které mohou působit auto-, para- a endokrinním způsobem. Obezita vede ke zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů, např. MCP-1, TNF- α , interleukinu 6. Tuková tkáň obézních pak vykazuje přítomnost chronického zánětu s infiltrací makrofágů, neutrofilů a dalších imunitních buněk, přičemž vyšší infiltrace makrofágů je u obézních ve viscerální oblasti ve srovnání se subkutánní. Obezita indukuje fenotypovou změnu makrofágů v bílé tukové tkáni zvýšením prozánětlivých M1 makrofágů a redukcí antizánětlivých M2 makrofágů [Guglielmi a Sbraccia, 2018].

Při expanzi tukové tkáně mohou rostoucí adipocyty zvětšovat mezikapilární vzdálenosti, což vede k místní hypoxii. To je následně spojeno s dysfunkcí nebo smrtí adipocytů a se zahájením zánětlivé odpovědi. Hypoxie tukové tkáně může rovněž přispívat k urychlené progresi nádorů u obézní populace [Gérard a Brown, 2018].

Jako součást regenerativního procesu, jako odpověď na zánět a lokální hypoxii zajišťují růstové angiogenní faktory a proteolytické enzymy remodelaci vaskularizace a extracelulární matrix a objevuje se také fibróza tukové tkáně. Je zajímavé, že přestože existuje množství důkazů prokazujících škodlivou úlohu zánětu tukové tkáně v komplikacích obezity, mohl by být zánět považován za adaptivní odpověď umožňující bezpečné skladování nadbytečných živin a přispívající k viscerální tukové bariéře, která efektivně filtruje endotoxiny [Guglielmi a Sbraccia, 2018].

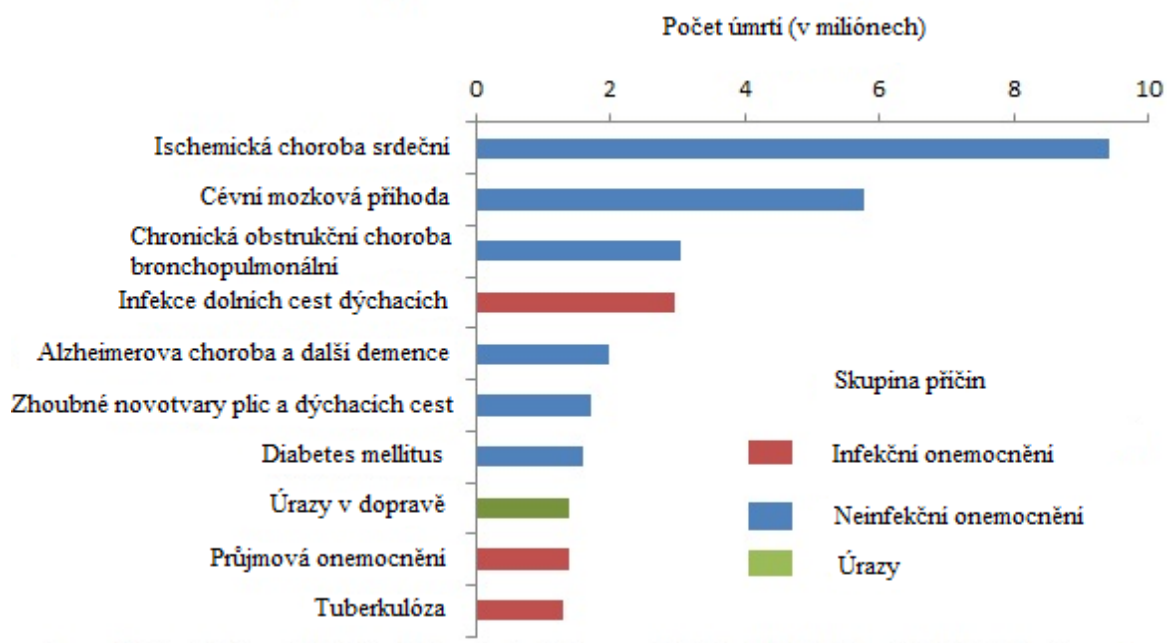
1.1.6 Komplikace obezity

WHO označila problém nadváhy a obezity jako šesté nejvýznamnější riziko, které ohrožuje lidské zdraví a významně zvyšuje morbiditu, mortalitu a zhoršuje kvalitu života.

Obezita úzce souvisí se zvýšeným výskytem dalších onemocnění (komplikací), jako je insulinová rezistence a DM2T, gestační diabetes, vysoký krevní tlak, kardiovaskulární onemocnění, dyslipidemie, systémový zánět a prokoagulační stav, často uváděné jako součásti tzv. kardiometabolického syndromu. Z dalších komplikací je v popředí i nealkoholická steatóza jater, chronická renální insuficience, spánková apnoe a ventilační nedostatečnost.

Jedinci s obezitou mají zvýšené riziko ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody [Urban a Little, 2018]. Tyto komplikace obezity jsou v žebříčku WHO deseti

nejčastějších příčin úmrtí v roce 2016 na 1. a 2. místě. Další z komplikací - diabetes mellitus – je na 7. místě, přestože se v roce 2000 do tohoto žebříčku ještě neřadila (obrázek 2) [WHO, 2018].



Obrázek 2 – Žebříček deseti celosvětově nejčastějších příčin úmrtí v roce 2016,
upraveno dle [WHO, 2018]

Z důvodu většího zatížení kostry v důsledku zvýšení tělesné hmotnosti trpí nosné klouby a postura s projevy artroz nosných kloubů a vertebrogenního algického syndromu [Urban a Little, 2018].

Z hlediska reprodukčního zdraví dochází u obézních ke zhoršení plodnosti a zvýšeného zdravotního rizika pro vyvíjející se plod i těhotnou ženu. Obezita je u žen spojena s anovulací. Ovulační potíže způsobují prodloužení doby těhotenství a přímo působí na oocyty, což se projevuje horším vývojem embrya [Best a Bhattacharya, 2015].

Epidemie obezity je rovněž doprovázena nárůstem mužské neplodnosti, což je způsobeno hormonálními poruchami, hypogonadismem a zhoršenými parametry kvality spermatu. Použití spermií obézních mužů pro *in vitro* fertilizaci může být spojeno s vyšším rizikem potratu a snížením počtu živě narozených dětí. Ze studií na zvířatech se ukazuje, že otcovská obezita může mít negativní dopad i na reprodukční a metabolické zdraví potomků [Chambers a Richard, 2015].

Obezita je spojena rovněž se zvýšeným rizikem některých typů nádorových onemocnění (kolorektální karcinom, karcinom pankreatu, karcinom dělohy, ovarií a prsu u žen, karcinom prostaty u mužů) [Heindel et al., 2015]. Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním u žen ve světě s více než 1,6 milióny zachycených nových případů ročně, což odpovídá čtvrtině všech nádorů diagnostikovaných u žen. V ČR bylo v roce 2015 zachyceno 7102 nových případů, což odpovídá incidenci 132,4 žen na 100

tisíc [ČOS ČLS JEP, 2018]. Epidemiologické studie identifikovaly mnohé důležité faktory rizika rakoviny prsu, jako je věk a rodinná zátěž, ale patří sem i nadváha a obezita. Obézní ženy s rakovinou prsu mají větší nádory, pokročilejší stádium onemocnění při diagnóze, vyšší míry metastáz a rozvoj rezistence endokrinní terapie. Obezita je asociována s vyšším rizikem rozvoje rakoviny prsu hlavně u postmenopauzálních žen. Více než 75 % nádorů prsu exprimuje estrogenový receptor. Estrogeny vznikají z androgenů pomocí enzymu aromatázy, jejímž zdrojem jsou stromální mesenchymální buňky a preadipocyty. Většina estrogenů v postmenopauzálním věku pochází z tukové tkáně, které mají právě obézní ženy nadbytek [Gérard a Brown, 2018].

1.1.7 Možnosti řešení problému obezity

Obezita se stala vzhledem k sedavému životnímu stylu a nezdravým stravovacím návykům celosvětovým zdravotním problémem, kterému lze preventivně předcházet. Je možné snížit počet pacientů s četnými komplikacemi a zamezit tak obrovským ekonomickým ztrátám spojených s jejich léčbou a pracovní neschopností.

Aktuální klinické přístupy k obezitě zahrnují dietoterapii, programy fyzické aktivity, psychologickou podporu, farmakoterapii a chirurgickou léčbu (bariatrické operace). Jedná se o obtížně léčitelné onemocnění, při kterém je nutná velká motivace pacienta. Intenzivně se zkoumají možnosti medikamentózní léčby, při níž se využívá hlavně tlumení chuti k jídlu, blokáda vstřebávání tuku v trávicím traktu, ovlivnění hormonů trávicího traktu (inkretinů) a nově i blokáda zpětné absorpce glukózy v ledvinách [Svačina et al., 2015]. Stále více je pak v léčbě obezity užíváno řešení pomocí bariatrické a metabolické chirurgie [Fried, 2017].

1.2 Tuková tkáň

Tuková tkáň byla dlouho považována pouze za pasivní zásobárnu energie. To se změnilo na konci 20. století, kdy byly objeveny hormony produkované tukovou tkání, které tak byla přiznána i funkce endokrinní, a později i funkce imunitní. V současné době je tuková tkáň na molekulární úrovni intenzivně zkoumána a poznatky z těchto výzkumů by mohly pomoci usnadnit léčbu obezity a jejích četných komplikací.

1.2.1 Histologie tukové tkáně

Tuková tkáň patří mezi pojivovou tkáň. Její kostrou je síť kolagenních vláken, na níž jsou fixovány buňky. Jedná se převážně o preadipocyty a maturované adipocyty. Je zde možné nalézt v okolí cév i vaskulární endoteliální buňky, dále fibroblasty, leukocyty, makrofágy, pericyty a další. Tuková tkáň je obklopena retikulárním vazivem a kapilárami [Čedíková et al., 2016].

1.2.2 Fyziologie tukové tkáně

Tuková tkáň slouží především jako rezervoár přebytečné energie, která je ve formě TG a esterů cholesterolu uchovávána v tukové kapénce adipocytů a v případě zvýšené potřeby je zase uvolňována. Vázáním přebytečných lipidů do TG je organismus rovněž chráněn před lipotoxicitou. Další z tradičně uváděných funkcí tukové tkáně je funkce tepelně-izolační a funkce mechanické ochrany orgánů proti nárazům.

V 90. letech 20. století, kdy byl jako první objeven hormon leptin produkovaný adipocyty, bylo zjištěno, že tuková tkáň neslouží pouze jako úložiště nadbytečné energie, ale je vysoce hormonálně aktivní tkání. Produkuje řadu biologicky aktivních látek proteinové povahy, které nazýváme adipokiny (adipocytokiny) (tabulka 3). Adipokiny nejsou produkované pouze adipocyty, ale i dalšími buňkami přítomnými v tukové tkáni. Pouze leptin a adiponektin jsou produkty výlučně pocházející z adipocytů. Hormony tukové tkáně působí buď přímo na buňky v okolí – na adipocyty, makrofágy a fibroblasty (funkce parakrinní) anebo jsou vyplavovány do krevního řečiště a ovlivňují vzdálenější orgány jako svaly, játra, mozek, endotel (funkce endokrinní). Regulují četné pochody v organismu, zejména příjem potravy, výdej energie, insulinovou senzitivitu, rozvoj zánětu, imunitní systém, funkci pohlavních žláz nebo rozvoj patologických komplikací [Krahmer et al., 2013].

**Tabulka 3 - Přehled nejdůležitějších známých proteinových hormonů
produkovaných tukovou tkání,
upraveno dle [Hainer, 2011]**

Název hormonu	Význam v organismu
Adiponektin	antiaterogenní účinky, zvýšení insulinové senzitivity
Agouti protein	regulace energetické homeostáze
Angiotenzinogen	regulace krevního tlaku
ASP (acylation stimulating protein)	regulace energetické homeostáze, imunitní děje, ovlivňuje rychlost syntézy TG
EGF (epidermal growth factor)	růstový faktor
FABP 4 (fatty acid binding protein 4)	regulace intracelulárního transportu mastných kyselin, ovlivnění zánětu a insulinové senzitivity
FGF 21 (fibroblast growth factor)	růstový faktor, regulace insulinové senzitivity
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	regulace růstu a metabolických dějů
IGFBPs (IGF-binding proteins)	regulace hladin IGF, metabolické účinky
IL-6 (interleukin 6)	prozánětlivý cytokin, modulace insulinové senzitivity
Leptin	regulace energetické homeostáze
MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)	prozánětlivý cytokin, regulace migrace a infiltrace monocytů/makrofágů
PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1)	protrombogenní účinky
RBP 4 (retinol binding protein 4)	regulace hladin retinolu, snížení účinků insulinu (indukce insulinové rezistence)
Rezistin	snížení insulinové senzitivity, účast v regulaci zánětu
TGF- β (transforming growth factor beta)	růstový faktor
TNF- α (tumor necrosis factor alpha)	prozánětlivý cytokin, snížení insulinové senzitivity
Visfatin	insulin-mimetický efekt

Hladiny leptinu (z řečtiny leptos = tenký) pozitivně korelují s obsahem tuku v organismu – u štíhlých jedinců jsou sníženy, u obézních zvýšeny. Leptin informuje centrum sytosti

v hypotalamu o stavu tukových zásob v organismu, čímž způsobuje omezení příjmu potravy a stimuluje energetický výdej. Snížení jeho hladiny u malnutričních stavů vede k šetření energie umožňující přežití při nedostatečném přívodu energie. Velmi vzácné úplné chybění leptinu důsledkem mutace vede u lidí k morbidní obezitě.

Adiponektin je látka s protizánětlivým účinkem. Hladina adiponektinu negativně koreluje s obsahem tuku v organismu. Adiponektin reguluje energetickou homeostázu, glukózový a lipidový metabolismus, stimuluje účinek insulínu a zvyšuje oxidaci mastných kyselin. V játrech redukuje produkci glukózy, snižuje endoteliální dysfunkci a zvyšuje utilizaci mastných kyselin tím, že se podílí na jejich oxidaci a využití jako zdroje energie. Adiponektin má zřejmě klíčovou úlohu ve vzájemném vztahu mezi obezitou a DM2T a insulinovou rezistencí [Haluzík et al., 2010].

Rezistin je hormon, pojmenovaný po své schopnosti indukovat insulinovou rezistenci. Tato jeho vlastnost byla však zaznamenána prozatím pouze u myši. U obézních lidí je rezistin zvýšený a pozitivně koreluje se zvýšenou adipozitou a zánětem.

Visfatin je produkovaný makrofágy tukové tkáně. Zvýšené hladiny visfatinu jsou popsány u nadváhy, obezity, DM2T a metabolického syndromu [Šimják et al., 2018]. Zvyšuje lipogenezi a diferenciaci adipocytů, čímž zvyšuje jejich depozitní schopnost.

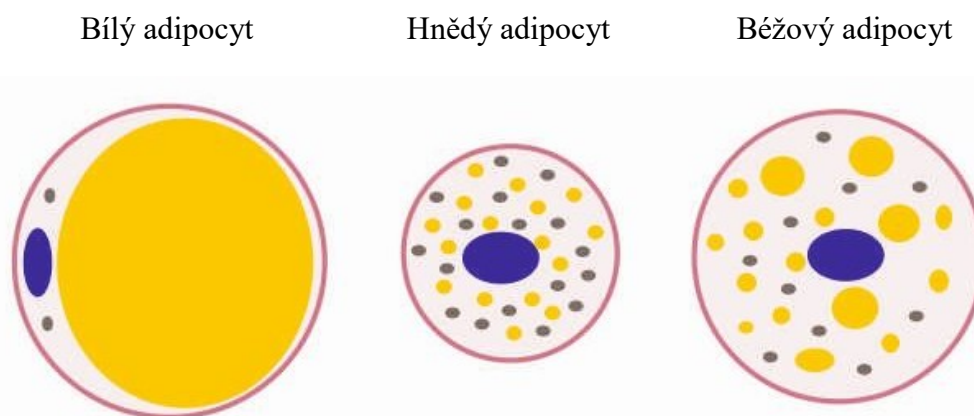
Interleukin 6 inhibuje insulinový receptor a zvyšuje lipolýzu při zátěži.

TNF- α je proinflamačním cytokinem produkovaným adipocyty u obézních. V experimentu jeho neutralizace významně zlepšuje insulinovou senzitivitu. Zároveň má tumorigenní potenciál [Hainer, 2011].

V poslední době se tuková tkáň zkoumá i jako místo akumulace xenobiotických látek – léků a toxických lipofilních látek. Protože tuková tkáň je endokrinní orgán, který produkuje a reaguje na hormony, může být tato její funkce narušena chemickými látkami v prostředí, které normální endokrinní funkce napodobují nebo blokují, tzv. endokrinními disruptory (viz kapitola 1.4.1.) [Müllerová a Kopecký, 2007; Heindel et al., 2015].

1.2.3 Typy tukové tkáně

U savců mohou být identifikovány dva hlavní typy tukové tkáně, obvykle klasifikované podle svého barevného vzhledu: bílá a hnědá (obrázek 3). Obě mají endokrinní vlastnosti, ale jejich funkce se liší. Bílá tuková tkáň lipidy uchovává, hnědá je spotřebovává pro termogenezi. Navzdory těmto protichůdným funkcím sdílejí schopnost vzájemné reverzibilní transdiferenciace k řešení zvláštních fyziologických potřeb [Cinti, 2018]. Tak byla identifikována ještě béžová (beige adipose tissue - bAT) a růžová tuková tkáň [Valencak et al., 2017].



Obrázek 3 – Hlavní morfologické charakteristiky bílých, hnědých a béžových adipocytů,

upraveno dle [Čedíková et al., 2016]

Legenda: (modrá = jádro; hnědá = mitochondrie; žlutá = tukové kapénky)

Bílá tuková tkáň je zapojená hlavně ve skladování a mobilizaci energie. Její buňky mají sférický tvar a v periferii umístěné zploštělé jádro. Zbytek buňky je vyplněn tukovou kapénkou a okolo se nacházejícím tenkým proužkem cytoplazmy s malým počtem mitochondrií a hladkým endoplazmatickým retikulem (ER). Tento typ tukové tkáně se u savců vyskytuje po celém těle. Rozlišujeme typ podkožní a intraabdominální (viscerální). Intraabdominální tuk obsahuje retroperitoneální, omentální, mezenterické, epikardické a gonadální úložiště. Hmotnost WAT obvykle představuje až 20 % tělesné hmotnosti normálního dospělého člověka a v první řadě působí jako úložní místo pro TG uchováváním přebytečných kalorií pro použití v době nedostatku. Bílé adipocyty přispívají k izolaci celého těla a jejich endokrinní funkce souvisejí se stupněm obezity a insulinovou senzitivitou.

Hnědá tuková tkáň je termogenním orgánem. Je odpovědná za netřesovou termogenezi, která je důležitá zejména během hibernace, a pro malé živočichy a děti, kteří mají větší požadavky na termogenezi z důvodu většího poměru povrch:objem. BAT může produkovat okolo 300 W/kg tepla ve srovnání s 1 W/kg ve všech ostatních tkáních. Hnědý adipocyt je obvykle menší než buňky WAT, jeho tvar je eliptický s kruhovým nebo oválným jádrem situovaným centrálně. Objem cytoplazmy je velký, obsahující mnoho malých tukových kapének a velké množství větších mitochondrií než má WAT.

Lidé mají poměrně velké zásoby BAT v kojeneckém věku a jen malé množství rozptýlené BAT přetrvává do dospělosti. Klasický hnědý tuk je rozšířen především v interskapulárním prostoru, paravertebrálně, axilárně a perirenálně. Nedávné studie potvrdily přítomnost aktivní BAT obsahující klasické hnědé i béžové adipocyty u dospělých lidí, s uložením

v cervikální, supraklavikulární, mediastinní, paravertebrální a suprarenální oblasti [Čedíková et al., 2016].

Běžovými adipocyty jsou nazývány hnědé adipocyty vyskytující se po termogenní stimulaci v anatomických místech odpovídajících WAT. Vznikají zřejmě z nově diferencovaných adipocytů anebo z bílých adipocytů jejich transdiferenciací. Tento proces se nazývá hnědnutí tukové tkáně.

Běžové adipocyty mají smíšené vlastnosti obou – bílých i hnědých adipocytů. V bazálním stavu vykazují unilokulární morfologii jako bílý adipocyt, ale po stimulaci chladem jejich vzhled získává rysy přechodné morfologie, která nakonec vyústí v expresi proteinů typických pro BAT a transformaci skladovaného tuku do malých tukových kapének charakteristických pro hnědé adipocyty.

V současnosti je za fyziologický stimul pro aktivitu BAT považováno také fyzické cvičení, které podporuje modifikaci bílého tuku na hnědý prostřednictvím spuštění genové exprese uncoupling proteinů (UCP). Tyto geny jsou situovány na vnitřní membráně mitochondrií a jejich význam spočívá v odpráhování dýchacího řetězce od syntézy ATP, což se projevuje uvolněním energie ve formě tepla. Porozumění těmto biologickým procesům a stimulace aktivity hnědých a běžových adipocytů by mohlo také pomoci s bojem proti obezitě, potenciálně se snížením tělesné hmotnosti, a zlepšit tak metabolické zdraví [Čedíková et al., 2016].

Přítomnost růžové tukové tkáně v savčím organismu je vázána na ženské pohlaví [Valencak et al., 2017]. Jde o alveolární žlázy, které se tvoří z bílých adipocytů v podkoží prsů během těhotenství a laktace. Růžové adipocyty obsahují četné cytoplazmatické lipidy, které jsou využívány při tvorbě mléka. V postlaktančním období se mění zase do WAT [Cinti, 2018].

1.2.4 Role mitochondrie v adipocyty

Mitochondrie jsou subcelulární semiautonomní buněčné orgány všech eukaryotických živočišných buněk kromě dospělých erytrocytů s vlastní mitochondriální DNA (mtDNA). Jedná se o dynamické struktury, které v buňce vytváří tzv. mitochondriální síť [Simula a Campello, 2018]. Skládají se ze čtyř kompartmentů – vnější membrány, mezimembránového prostoru, vnitřní membrány a na proteiny bohaté matrix. Probíhají v nich různé metabolické procesy.

Primární funkcí mitochondrie je produkce energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) skrze proces oxidativní fosforylace v dýchacím řetězci nacházejícím se na vnitřní mitochondriální membráně. Jsou zapojeny do klíčových metabolických procesů včetně cyklu trikarboxylových kyselin a dekarboxylace pyruvátu (Krebsův cyklus), oxidativní

dekarboxylace mastných kyselin (β -oxidace), a degradace rozvětvených aminokyselin, proto není překvapující, že jejich narušená aktivita má často souvislost s metabolismem a diferenciací adipocytů. Mezi další významné funkce mitochondrie patří její úloha ve stresové odpovědi či apoptóze.

Mitochondrie jsou tedy nezbytné pro udržení normálních fyziologických funkcí buněk mnoha tkání, včetně srdeční a kosterní svaloviny, mozku, jater a tukové tkáně. Jejich dysfunkce může způsobit patologické změny v lidském těle. Počet mitochondrií a jejich morfologie je v eukaryotických buňkách regulován jako adaptivní odpověď na různé podněty z okolí (např. buněčný růst, smrt a diferenciace, nebo modifikace v energetické náročnosti).

Vady v mitochondriální lipogenezi a lipolýze, regulace diferenciace adipocytů, apoptózy, produkce reaktivních kyslíkových radikálů, účinnost oxidativní fosforylace a regulace konverze bílých adipocytů do béžových adipocytů mohou hrát důležitou roli ve vývoji obezity.

Mitochondrie WAT exprimují proteiny, které podporují anabolickou lipogenní funkci, ale také degradují xenobiotika a endogenní molekuly, což ukazuje také ochrannou úlohu této tkáně. Jsou tedy důležité pro regulaci celé energetické homeostáze těla, v signalizaci mezi tukovou tkání a pruhovaným svalstvem nebo v kontrole insulinové senzitivity a metabolismem glukózy.

Mitochondriální dysfunkce může být důsledkem poklesu biogeneze mitochondrií, zmenšení jejich velikosti, anebo snížení obsahu proteinů a aktivity oxidativních proteinů mitochondrií. Hlavní tkáně postižené mitochondriální dysfunkcí jsou ty s vyšší energetickou náročností, jako je srdce, svaly, mozek a endokrinní žlázy.

Mezi důležité faktory přispívající k mitochondriálním poruchám v tukové tkáni jsou oxidační stres, insulinová rezistence, genetické faktory a také sedavý životní styl bez pohybové aktivity. Jsou dostatečné důkazy, že jakékoliv poškození mitochondriálního dýchacího řetězce vede ke zhoršení diferenciace adipocytů. Vysoké koncentrace mitochondriálních reaktivních kyslíkových radikálů uvolňovaných dýchacím řetězcem mají také škodlivý vliv na proliferaci a diferenciaci adipoblastů.

Změny v lidském chování a životním stylu v posledním století měly za následek celosvětové dramatické zvýšení incidence diabetes mellitus 2. typu (DM2T) a obezity. Sedavý způsob života, změny v práci (z těžké práce na sedavou) měly dopad na lidské zdraví. Fyzická aktivita je důležitým regulátorem mitochondriálních funkcí ve svalových buňkách a dlouhodobá neaktivita je asociována s redukovanou funkcí a počtem mitochondrií [Čedíková et al., 2016].

1.3 Tuková kapénka

Tukové kapénky, dlouho považované za pasivní rezervoár zásobní energie ve formě lipidů, mají ve skutečnosti nenahraditelnou roli v mnohých fyziologických a patofyziologických pochodech. Vzhledem k zvyšující se prevalenci obezity, DM2T a dalších složek kardiometabolického syndromu, nádorových a neurodegenerativních onemocnění, kde by pochopení fyziologických funkcí a procesů uvnitř tukové kapénky mohlo přispět k jejich léčbě, se tukové kapénky v současnosti dostávají do popředí zájmu výzkumu [Fujimoto a Parton, 2011].

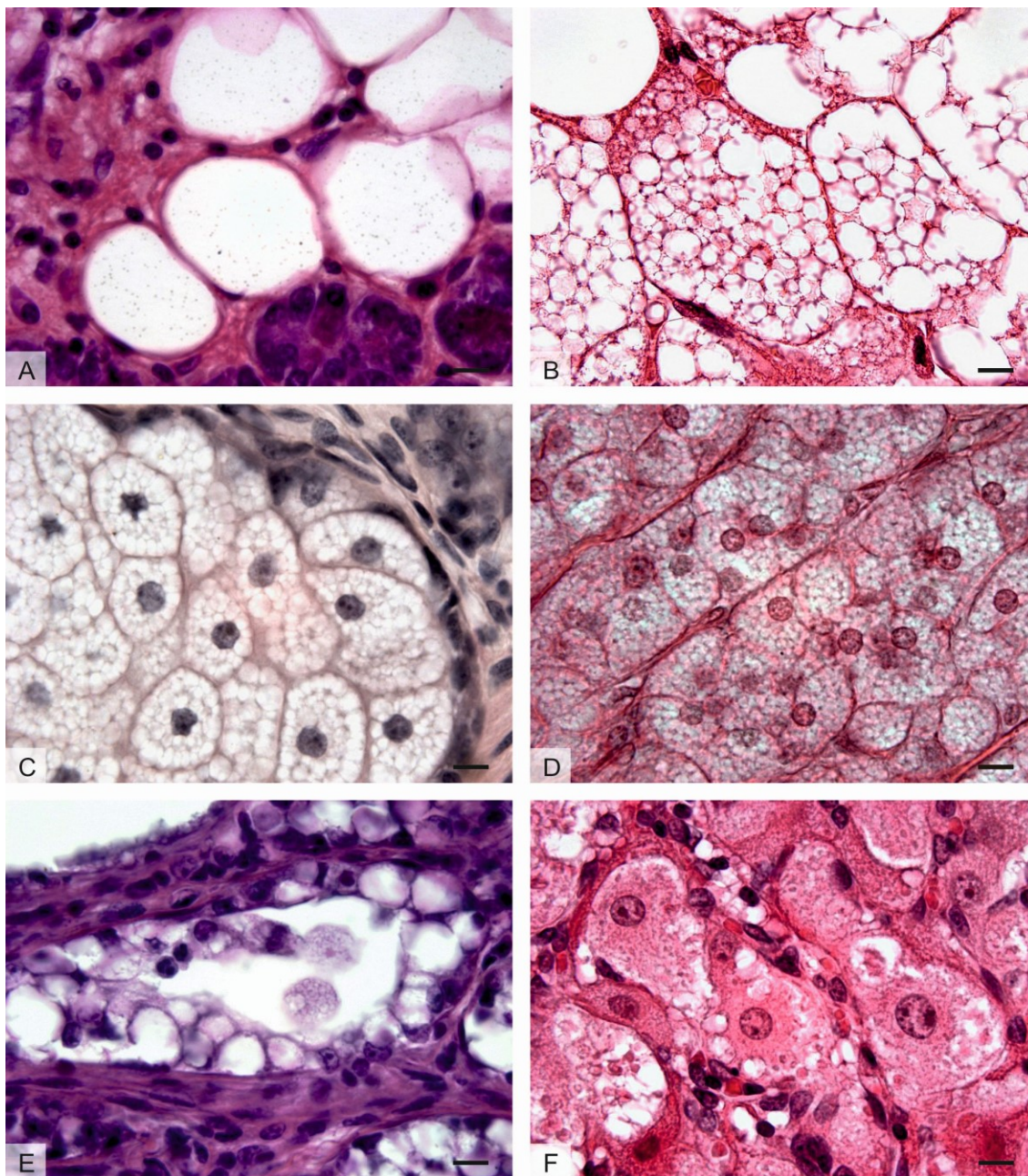
Jsou přítomné ve většině buněk, kde jsou potřebné pro metabolismus lipidů a energetickou homeostázu. Jedná se o dynamické orgány, které jsou heterogenní ve struktuře, chemickém složení a tkáňovém rozložení. V proměnlivém počtu a velikosti se nacházejí v mnoha různých typech eukaryotických buněk (tabulka 4, obrázek 4).

Jejich hlavní funkcí je skladování tuků ve formě hydrofobních TG, na což jsou nejvíce specializované buňky bílé tukové tkáně. Schopnost skladovat energii je pro organismy evoluční výhodou.

Tabulka 4 - Příklady výskytu tukových kapének a jejich funkce v různých buněčných typech

[Dvořáková et al., 2018]

Buněčný typ	Funkce tukové kapénky
Adipocyt [Fujimoto a Parton, 2011] Hepatocyt [Carr a Ahima, 2015] Kardiomyocyt [Wang et al., 2013] Myocyt kosterní svaloviny [Bosma, 2016]	energetická zásoba, udržování homeostáze, ukládání nadbytečných tuků jako ochrana proti lipotoxicitě
Itova buňka v játrech [Puche et al., 2013]	skladování vitamínů rozpustných v tucích (vitamín A)
Buňky <i>zony fasciculata</i> v kůře nadledvin [Tachibana et al, 2016]	skladování esterů cholesterolu a dalších prekurzorů pro syntézu glukokortikoidů
Leydigovy buňky varlat [Shen et al., 2016] Buňky <i>theca interna</i> vaječníků [Shen et al., 2016] Buňky <i>corpus luteum</i> [Niswender, 2002]	skladování esterů cholesterolu pro syntézu steroidních hormonů
Chondrocyt [Mansfield et al., 2013]	ukládání nenasycených mastných kyselin – energetická zásoba
Sebocyt [Schneider et al., 2016]	sekreční, udržování permeability kožní bariéry
Epiteliální buňky alveol mléčné žlázy (tzv. růžový adipocyt) [Russell et al., 2011]	sekreční, tvorba mléka
Vaječná buňka živočichů [Welte, 2009]	energetický zdroj pro embryogenezi
Makrofág [Welte, 2015]	řízení lipidové signalizace, cíl útoku patogenů
Pneumocyt II. typu [Castranova et al., 1988]	sekreční, tvorba surfaktantu
Enterocyt [Beilstein et al., 2016]	přechodné uložení lipidů při absorpci z potravy, cíl útoku patogenů, např. rotavirů a enterovirů



Obrázek 4 - Tukové kapénky v různých buněčných typech

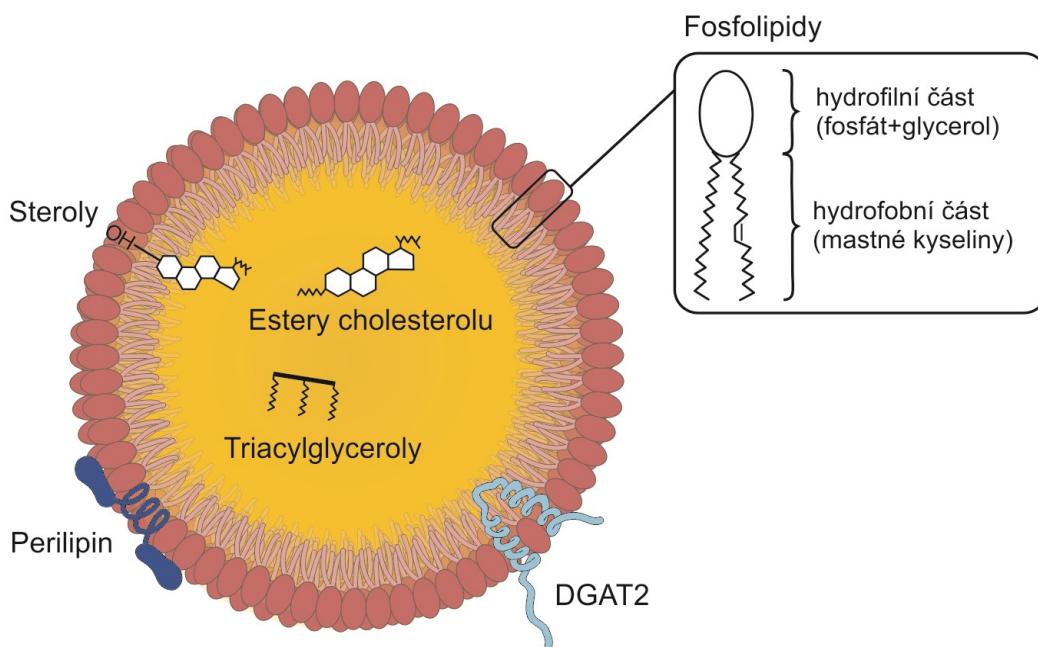
[Dvořáková et al., 2018]

Legenda: **4A** Adipocyty bílého tukového vaziva *glandula parotis*. Velká tuková kapénka vyplňuje téměř celou buňku („prázdné“ prostory uvnitř buňky). Jádro a ostatní organely jsou umístěny excentricky na okraji buňky a společně s úzkým lemem cytoplazmy vytvářejí na běžných histologických preparátech tvar pečetiho prstenu. **4B** Multiloculární adipocyty hnědé tukové tkáně obsahující velké množství tukových kapének menších rozměrů. **4C** Sebocyty - mazové žlázy kůže s holokrinním způsobem sekrece. Obsahují velké množství menších tukových kapének, jejichž nahromadění postupně vede k porušení cytoplazmatické membrány, a tak k jejich uvolnění společně s buněčným obsahem – kožním mazem (sebum). **4D** Epitelové buňky *zona fasciculata* kůry nadledvin uspořádané do podlouhlých provazců obsahují velké množství tukových kapének. **4E** Mléčná žláza

v laktačním období s apokrinním způsobem sekrece. Světlé galaktocyty vyskytující se v sekrečních alveolech mléčné žlázy hromadí v apikální části cytoplazmy tukové kapénky, které se společně s tenkou vrstvou apikální cytoplazmy uvolňují do mléka. **4F** Granulóza-luteinní buňky *corpus luteum* vaječníku s pěnítou (vakuolizovanou) cytoplazmou, jejíž vzhled je podmíněn množstvím tukových kapének. (*Foceno imerzním objektivem se zvětšením 100x. Měřítka = 10 μm. Preparáty barveny hematoxylinem a eosinem.*)

1.3.1 Struktura tukové kapénky

Tukové kapénky (obrázek 5) mají kulovitý tvar. Mohou se seskupovat do hroznovitých struktur [Penno et al., 2013]. Jejich průměr se pohybuje v rozmezí od 0,1 – 5 μm u netukových buněk, u bílých adipocytů pak mohou dosahovat velikosti větší než 100 μm [Fujimoto et al, 2008].



Obrázek 5 - Struktura tukové kapénky,
upraveno dle [Farese a Walther, 2009]

Legenda: V monovrstvě na povrchu jsou částečně polární (amfipatické) fosfolipidy a steroly. V hydrofobním centru jsou uskladněny TG a estery cholesterolu. Na povrchu tukové kapénky jsou různé proteiny syntetizující neutrální lipidy (např. DGAT2) a proteiny skupiny PAT řídící ukládání a využití tuků (např. perilipin).

Tukové kapénky jsou tvořeny hydrofobním jádrem z neutrálních lipidů pokrytých monomolekulární fosfolipidovou vrstvou. Ta je tvořena více druhy fosfolipidových molekul [Penno et al., 2013]. Nejhojněji je zastoupen fosfatidylcholin, v menším množství je nalézán fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, lysofosfatidylcholin a

lysofosfatidylethanolamin. Dále mohou být ve fosfolipidové membráně identifikovány amfifilní proteiny (mj. perilipiny v tukových buňkách a buňkách produkujících steroidní hormony). Rovněž se zde může nacházet volný cholesterol, který se pravděpodobně vyskytuje i uvnitř tukové kapénky [Fujimoto a Parton, 2011].

K povrchu tukové kapénky jsou přichyceny specifické proteiny, kterých může být 50 – 200. Mnohé z nich se účastní metabolismu lipidů. Jejich spektrum se může lišit mezi tukovými kapénkami různých velikostí nebo různého lipidového složení. Monomolekulární vrstva je velmi důležitá pro regulaci velikosti tukové kapénky a pro její schopnost komunikovat a interagovat s ostatními tukovými kapénkami nebo organelami, např. s ER a mitochondriemi [Wilfling et al., 2014].

Uvnitř tukové kapénky se rovněž nacházejí proteiny. Hydrofilní proteiny pravděpodobně samy v kapénce neexistují, ale amfifilní proteiny se mohou skládat s fosfolipidy a vytvářet tak struktury kompatibilní s hydrofobním prostředím [Fujimoto a Parton, 2011]. Jedná se například o proteiny ze skupiny perilipinů, tj. tail-interacting protein (TIP47) a adipofilin (ADRP), u nichž se předpokládá zapojení i do nitrobuněčného metabolismu lipidů [Robenek et al., 2005].

V tukové kapénce se střeďují neutrální tuky – TG a estery cholesterolu. V bílých adipocytech jsou uloženy převážně TG, ale ve většině ostatních buněčných typů koexistují TG a estery cholesterolu v různých poměrech [Czabany et al., 2008].

1.3.2 Biogeneze tukové kapénky

Proces tvorby tukových kapének (lipogeneze) probíhá buď *de novo* nebo mohou být tukové kapénky odvozeny od již existujících kapének dělením [Fujimoto a Parton, 2011]. Upřednostňovaný proces vzniku *de novo* probíhá ve třech fázích. Nejprve dochází k syntéze neutrálních lipidů, pak k jejich akumulaci a vzniku čočkovité formace a nakonec k odškrcení tukové kapénky z ER směrem do cytosolu [Wilfling et al., 2014].

Neutrální lipidy jsou syntetizovány izoformami enzymů vázaných v membráně ER, a to acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferázami (DGAT1, DGAT2) a acyl-CoA:cholesterol acyltransferázami (ACAT1, ACAT2) [Wilfling et al., 2014].

Vzniklé lipidy se akumulují v hladkém ER na místech oddělených od syntetizačních enzymů. Po nahromadění určitého množství a překročení konkrétního prahu se v ER vytvoří tukové čočky, které se vyklenují směrem do cytoplazmy. Tomu, aby se tuková kapénka vytvořila směrem do lumen ER, brání protein FIT2 [Chen a Goodman, 2017].

Nad určitou velikost, v závislosti na fosfolipidovém složení, jsou čočkovité formace tuků v ER nestabilní a mechanismem podobným odškrcení dochází k jejich uvolnění. Nejmenší

zralé cytosolické tukové kapénky mají průměr v rozsahu 250 – 500 nm, ale není vyloučeno, že rodící se kapénky mohou být i menší než 100 nm.

Do vývoje vznikajících tukových kapének jsou zapojeny i některé proteiny, které mohou stabilizovat nebo zlepšovat počáteční konvexní zakřivení kapének. Tuto funkci zřejmě zastává TIP47 ze skupiny perilipinů, který je považován za hlavní regulační protein [Hashemi a Goodman, 2015]. Nicméně se předpokládá, že tvorba kapének může probíhat spontánně, přičemž proteiny ji mohou pouze usnadňovat nebo regulovat [Wilfling et al., 2014].

Dalšími proteiny účastnicími se vzniku tukových kapének jsou např. seipin (BSCL2, Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy), lipiny a transmembránové proteiny vyvolávající ukládání tuku (FIT1/FITM1 a FIT2/FITM2). Seipin je regulátor katabolismu lipidů, dále je nezbytný pro diferenciaci adipocytů a pro správné ukládání lipidů. Jedná se o protein ER, jehož nedostatek dramaticky snižuje počet a velikost tukových kapének [Wilfling et al., 2014]. Při absenci seipinu je formování tukových kapének zpožděné. Dochází k akumulaci neutrálních lipidů v ER, čímž se mohou dostat na nevhodná místa, např. do jádra. Mutace seipinu vedou k některým lipodystrofiím.

Lipiny jsou v savčích buňkách exprimovány v pěti izoformách. Jsou nutné k zabránění velké akumulace neutrálních lipidů v ER [Hashemi a Goodman, 2015]. FIT1 je primárně exprimován v kosterním svalstvu a FIT2 v tukové tkáni. Tyto proteiny nesyntetizují TG, ale nejspíše je rozdělují do vznikajících tukových kapének [Gross et al., 2011].

1.3.3 Růst tukové kapénky

Tukové kapénky jsou schopné měnit svůj počet a velikost v závislosti na potřebách buňky. Proto je jejich velikost v maturovaných buňkách různá a závisí na konkrétním buněčném typu a na metabolických podmínkách uvnitř buňky. Největší tukové kapénky nacházíme v adipocytech WAT, jejichž velké unilokulární tukové kapénky představují nejefektivnější uložení energie. Tvorba unilokulárních kapének je podporovaná proteiny skupiny CIDE (cell death-inducing DFF45-like effector). Jsou lokalizované především na kontaktních místech mezi kapénkami, kde usnadňují přenos lipidů z menších kapének na větší. Jejich nedostatek tvorbě unilokulárních kapének brání a naopak nadměrná exprese indukuje vznik větších tukových kapének o menším množství [Schuldiner a Bohnert, 2017].

Velké tukové kapénky vznikají dvěma mechanismy, buď růstem, nebo vzájemným spojováním (fúzí) malých tukových kapének ve větší. Růst tukových kapének probíhá přidáváním neutrálních lipidů do hydrofobního centra a polárních lipidů (fosfolipidů a sterolů) na jejich povrch [Boschi et al., 2015].

Vzájemná fúze je závislá na mikrotubulech a molekulárních motorech, jako jsou dynein a kinesin. Podílejí se na ní proteiny SNARE (SNAP receptory), dále SNAP23

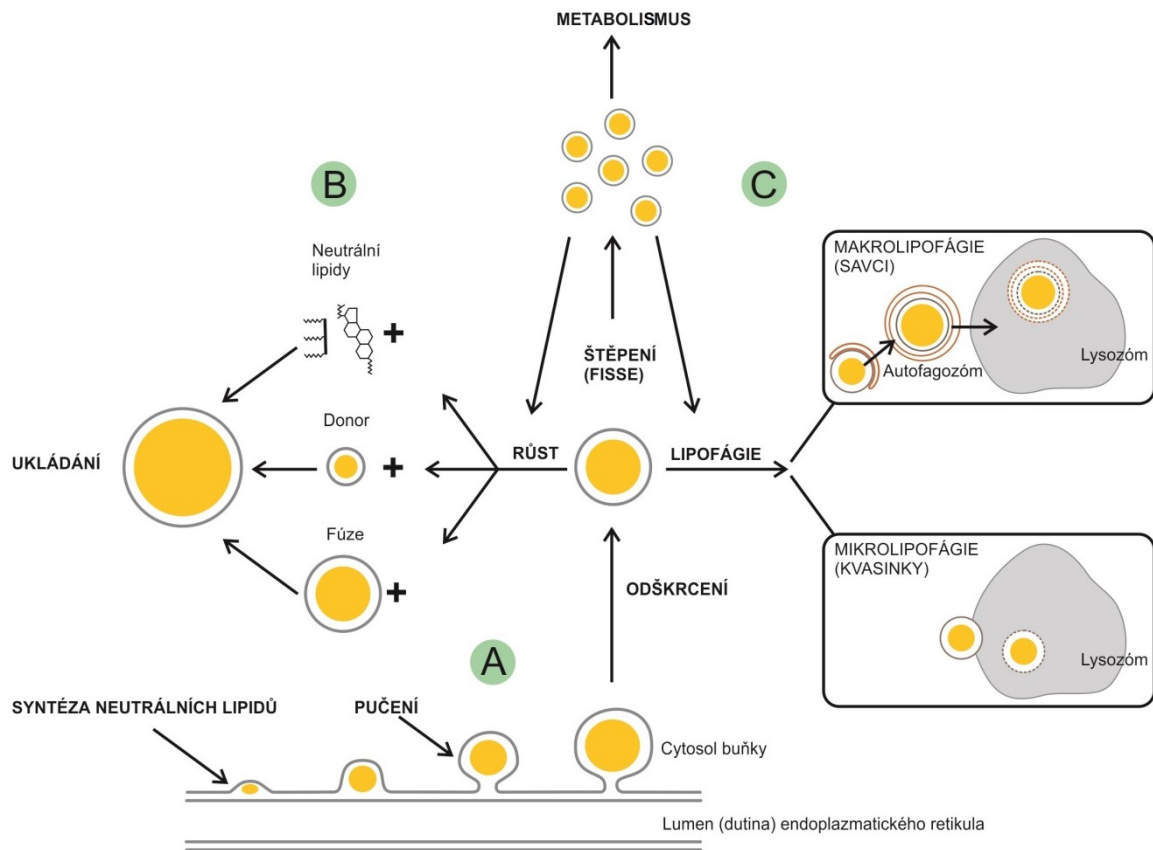
(synaptosomal-associated protein), syntaxin-5 a VAMP4 (vesicle-associated membrane protein 4). Mutací genů pro tyto proteiny se snižuje rychlost fúze a velikost tukových kapének [Boström et al., 2007].

1.3.4 Rozpad a zánik tukové kapénky

V kontrastu procesu růstu tukových kapének byl v adipocytech po silné lipolytické stimulaci pozorován rovněž proces jejich štěpení. Ten je charakteristický fragmentací tukové kapénky na velké množství malých dispergovaných kapének. Zvýšení počtu, a tak také zvětšení povrchu kapének, je nezbytné pro umožnění přístupu lipázy k jádru tvořenému TG. Lipidy uvolněné při tomto procesu mohou být buňkou využity pro metabolismus, ale i k tvorbě nových tukových kapének [Boschi et al., 2015].

Využití neutrálních lipidů z kapének se také účastní hormonálně řízený autofágický proces nazvaný lipofágie. Při lipofágii obalí tukovou kapénku dvojitá membrána, vytvoří se autofagozóm, který předchází fúzi s lysozomem (makroautofágie, přítomno u savců) anebo je kapénka pohlcena lysozomem rovnou (mikroautofágie, přítomno u kvasinek) [Hashemi a Goodman, 2015]. Degradace tukových kapének autofágií hraje zásadní roli při mobilizaci volných mastných kyselin pro metabolismus, udržování lipidové homeostáze v tukových kapénkách, ale také při adaptaci buňky na lipidovou nerovnováhu při hladovění [Garcia et al., 2018].

Životní cyklus tukové kapénky je schematicky znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6 - Životní cyklus tukové kapénky,
upraveno dle [Hashemi a Goodman, 2015]

Legenda: **6A** – Biogeneze tukové kapénky. Na membráně ER dochází k syntéze neutrálních lipidů, tuková kapénka pučí a odškrcuje se směrem do cytosolu buňky. **6B** – Růst tukové kapénky přidáváním neutrálních lipidů do hydrofobního jádra a vzájemnou fúzí různě velkých kapének. Ukládání v tukové tkáni. **6C** – Rozpad a zánik tukové kapénky. Tuková kapénka se po lipolytické stimulaci štěpí na množství dispergovaných kapének. Část těchto kapének je využita pro metabolismus, další se vracejí do procesu tvorby nových tukových kapének. Degradace tukových kapének probíhá také autofágií (lipofágie). U savců vzniká autofagozóm tak, že je tuková kapénka nejprve obalena dvojitou membránou a pak pohlcena lysozomem (makrolipofágie), u kvasinek je tuková kapénka pohlcena rovnou (mikrolipofágie).

1.3.5 Skupina PAT proteinů

V ukládání a využití tuků v tukových kapénkách mají hlavní regulační roli PAT proteiny umístěné na povrchu tukové kapénky (tabulka 5). Tato skupina proteinů je pojmenována podle prvního písmene prvních tří členů.

Liší se od sebe velikostí, tkáňovou expresí, afinitou k tukovým kapénkám, stabilitou a transkripční regulací. Tyto rozdíly způsobují, že každý z PAT proteinů má odlišné buněčné

funkce, ale všechny pravděpodobně regulují rozhraní mezi tukovými kapénkami a buněčným prostředím, řídí přístup lipáz k lipidům uvnitř jádra a rovněž se mohou účastnit buněčných procesů důležitých pro biogenezi kapének [Bickel et al., 2009].

Tabulka 5 - PAT proteiny

upraveno dle [Bickel et al., 2009; Kimmel et al., 2010; Wang et al., 2013; Han et al., 2018]

Zkratka protein kódujícího genu	Další názvy	Funkce
PLIN1	perilipin 1; u savců 3 izoformy (A, B, C)	řídí (omezuje i usnadňuje) přístup lipáz ke kapénce; marker adipocytární diferenciace
PLIN2	perilipin 2; adipofilin; ADRP - adipose differentiation-related protein	podílí se na vývoji tukové tkáně, řízením ukládání lipidů; výskyt rovněž u fibroblastů, endotelových a epitelových buněk (mléčná žláza, adrenální kůra, Sertolihovy a Leydigovy buňky), hepatocyty u alkoholické jaterní cirhózy – slouží jako marker akumulace lipidů v různých typech buněk u různých onemocnění
PLIN3	perilipin 3; TIP47 - tail-interacting protein	podílí se na tvorbě tukových kapének; potřebný pro transport endosomu do Golgiho aparátu; výrazně exprimován v rakovině děložního čípku (nový biomarker)
PLIN4	perilipin 4; S3-12	výskyt na povrchu tukových kapének adipocytů a buněk srdečního a kosterního svalstva; podílí se na akumulaci lipidů v srdci (role v patologických degenerativních podmínkách)
PLIN5	perilipin 5; OXPAT	chrání tukové kapénky před lipolytickou degradací

1.3.6 Funkce tukových kapének

Všechny funkce tukových kapének jsou dány jejich unikátní strukturou [Murphy et al., 2009; Tauchi-Sato et al., 2002; Walther a Farese, 2009]. Hlavní funkcí je skladování lipidů a to v adipocytech i v neadipocytárních buňkách. Skladované lipidy slouží jako energetická zásoba a to nejen pro vlastní intracelulární potřebu, ale poskytují i energetickou rezervu ostatním tkáním. Jsou mobilizovány pro β -oxidaci, biogenezi membrán, posttranslační modifikaci proteinů, syntézu lipoproteinů, steroidů, signálních lipidů, jiných lipidových mediátorů. Slouží jako rezervoár různých proteinů, včetně transkripčních faktorů a komponent chromatinu, a také se v nich ukládají vitamíny rozpustné v tucích [Puche et al., 2013].

Klíčovými enzymy zapojenými v intracelulární degradaci TG v adipocytech i v neadipocytárních buňkách jsou adipocytární triglyceridová lipáza (ATGL) a hormon-senzitivní lipáza (LIPE neboli HSL) [Morak et al., 2012].

Lipidové kapénky rovněž chrání buňky před toxickým účinkem volných mastných kyselin. Ty mohou ohrozit integritu membrány, ale esterifikací do neutrálních TG se stávají stabilními a neškodnými [Welte, 2015].

Kromě běžných funkcí souvisejících se skladováním lipidů nebo jejich metabolismem jsou tukové kapénky zapojeny i do dalších důležitých procesů v buňce, i takových, které se přímo k lipidovému metabolismu nevztahují, a které jsou často spojené s patologickými stavy [Murphy et al., 2009]. Tukové kapénky jsou důležité pro replikaci a životní cyklus virů a jiných intracelulárních patogenů [Roingeard a Melo, 2017]. Mezi patogeny využívající tukové kapénky pro svoji proliferaci a přežití patří například *Chlamydia trachomatis* a virus hepatitidy C [Fujimoto a Parton, 2011].

Významné pro vznik metabolických onemocnění je rovněž uskladnění perzistentních organických polutantů (POP) v tukových kapénkách adipocytů. Jedná se o látky jako organochlorované pesticidy, bifenyly, dioxiny a dibenzofurany, bromované zpomalovače hoření a další (viz kapitola 1.4.3). Jsou to látky lipofilní, bioakumulativní, do lidského těla se dostávají hlavně živočišnou tučnou potravou. Řadíme je mezi tzv. endokrinní disruptory, protože poškozují embryonální vývoj a reprodukční schopnosti a podílejí se na vzniku obezity a jejích komplikací, zejména rozvoji DM2T [Müllerová et al., 2017].

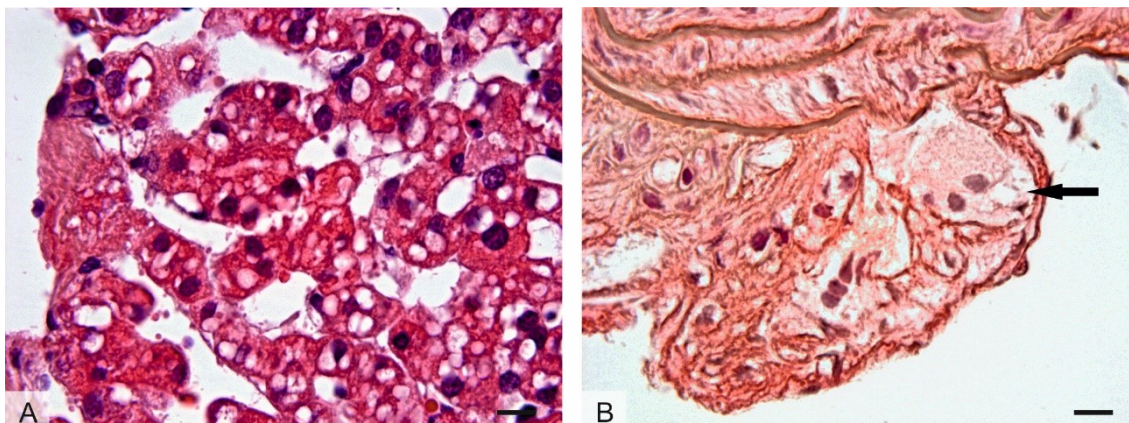
Je známo, že tukové kapénky hrají důležitou roli i v imunitním systému. Jsou místem syntézy eikosanoidů, signálních lipidů ovlivňujících např. zánět, bolest a kontrakce hladké svaloviny. Pro jejich syntézu je prekurzorem kyselina arachidonová [Bozza a Viola, 2010].

1.3.7 Patologické stavy spojené s tukovými kapénkami

S nedostatkem nebo naopak nadbytkem tukových kapének v buňce je spojena celá řada onemocnění (tabulka 6). Pochopení mechanismů, které se v kapénkách odehrávají, může osvětlit řadu patologických stavů a poskytnout příležitost k jejich léčbě [Krahmer et al., 2013].

Tabulka 6 - Patologické stavy asociované s dysfunkcí tukových kapének,
upraveno dle [Krahmer et al., 2013; Welte, 2015; Tirinato et al., 2015; Abramczyk et al., 2015; Bizzari et al., 2017]

Onemocnění	Přítomnost a role tukové kapénky
Lipodystrofie	nedostatek bílé tukové tkáně způsobený genetickým defektem, akumulace lipidů v jiných tkáních
Kachexie	ztráta tukové tkáně při nádorovém onemocnění zvýšenou lipolýzou
Chanarin-Dorfmanův syndrom (ichtyóza) a myopatie	genetická porucha, deficit degradace TG, akumulace tuků v jiných tkáních
Obezita, metabolický syndrom a diabetes	překročení kapacity tukové tkáně, nadměrné zmnožení tukových kapének, hypertrofie adipocytů, porucha hormonální funkce tukové tkáně, akumulace tuku i v jiných tkáních
Steatóza jater	akumulace tukových kapének v hepatocytech (obrázek 7A)
Kardiovaskulární onemocnění	překročení kapacity tukových kapének pěnových buněk (makrofágů) strádajících estery cholesterolu (obrázek 7B)
Onemocnění nervového systému	hromadění tukových kapének v gliích při neurodegeneraci, mutace genů účastnících se biologických procesů v tukových kapénkách
Nádorová onemocnění	zvýšené množství tukových kapének u buněk agresivnějších nádorů



Obrázek 7 - Histologický obraz tkání u patologických stavů spojených s tukovými kapénkami

[Dvořáková et al., 2018]

Legenda: **7A** – Játra prasete domácího s obrazem jaterní steatózy s nahromaděním tukových kapének v cytoplasmě hepatocytů. **7B** – Preparát karotidy myši s aterosklerotickým plátem stádia II histologické klasifikace. V subendotelové vrstvě vaziva se nacházejí velké pěnové buňky – mnohojaderné makrofágy s nahromaděním tukových kapének (šipka).

1.4 Obezogeny

1.4.1 Hypotéza obezogenů

Výskyt obezity a onemocnění s ní souvisejících již dosahuje epidemických rozměrů. Jako hlavní příčina bylo kromě nadměrného příjmu potravin a nedostatku fyzické aktivity identifikováno genetické pozadí. Avšak tyto podmínky samy o sobě nevysvětlují všechny příčiny vzniku obezity, DM2T a dalších metabolických onemocnění, což vedlo k hypotéze, že se jich účastní ještě další složky [Muscogiuri et al., 2017].

Po druhé světové válce došlo k prudkému rozvoji průmyslu, což mělo za následek velké znečištění životního prostředí [Yang et al., 2017]. Postupně se začaly objevovat informace o látkách, které mohou narušovat energetickou rovnováhu ve prospěch přibírání na hmotnosti a vzniku obezity u exponovaných jedinců. Tyto chemické látky poškozující metabolické procesy a zasahující do hormonálních funkcí byly nazvány endokrinní disruptory neboli obezogeny či diabetogeny [Grün a Blumberg, 2006].

Lidská populace je obezogenům denně vystavena ve vnějším i vnitřním prostředí. Tyto látky jsou používány jako součásti mnoha produktů (přípravky na ochranu rostlin, průmyslové výrobky a výrobky pro domácnost, plasty, detergenty, zpomalovače hoření a přípravky osobní hygieny). Činností člověka se dostaly do vody, půdy a potravin.

Obezogeny způsobují zvýšenou adipogenezi a větší ukládání tuku v tukových buňkách. Nepřímo působí také na složení střevní mikroflóry, bazální metabolismus a hormonální kontrolu chuti k jídlu a pocitů sytosti. Mimořádně znepokojující je, že expozice těmto látkám má škodlivější účinek během nitroděložního vývoje a v novorozeneckém období než expozice v dospělosti [Muscogiuri et al., 2017].

1.4.2 Přehled známých a pravděpodobných obezogenů (endokrinních disruptorů)

Endokrinní disruptory jsou definovány jako exogenní látky, které mají nepříznivý zdravotní efekt v důsledku změn endokrinních funkcí. Některé tyto sloučeniny jsou látky přírodního původu (rostlinné fytoestrogeny), ale většinou jde o syntetické chemické látky, které se dostaly do životního prostředí lidskou činností bez předchozí znalosti jejich účinků na ekosystémy a lidské zdraví [Darbre, 2017].

1) K přírodním látkám s obezogením efektem patří fytoestrogeny a fruktóza:

Fytoestrogeny jsou přirozeně produkovány rostlinami, a tak jsou konzumovány lidmi v jedlých rostlinných částech. Látkami s estrogení aktivitou jsou například izoflavony genistein a daidzein, které se nacházejí v sójových bobech, čočce a cizrně. Protože to jsou však látky přirozeně se vyskytující, jsou jako takové obecně společností pozitivněji

přijímány, a ve srovnání s možnými nepříznivými účinky je zvýrazňována jejich nutriční hodnota [Darbre, 2017; Newbold et al., 2009].

Fruktóza, monosacharid obsažený v ovoci a v medu, ovlivňuje vznik obezity více než glukóza. Díky svému odlišnému metabolismu a vysokému lipogennímu potenciálu umožňuje ukládat nadbytečné tuky v játrech a zvyšovat hmotnost viscerální tukové tkáně [Goran et al., 2013]. V poslední době se hojně používá v potravinářském průmyslu hlavně v nealkoholických nápojích a sladkostech a její vysoká spotřeba napomáhá k nárůstu obezity, insulinové rezistence, metabolických a kardiovaskulárních onemocnění [Tappy, 2018].

2) Mezi syntetické chemické látky s obezogením efektem řadíme některé skupiny léků, aditiva v potravinách, ftaláty, bisfenol A, parabeny a perzistentní organické polutanty (POP):

Léky

Je prokázáno, že některé skupiny léků patří mezi látky s endokrinní aktivitou. Je to zejména diethylstilbestrol (nesteroidní estrogen používaný v antikoncepčních preparátech), u něhož je prenatální expozice spojena s přibýváním na váze v dospívání, poškozením reprodukčních orgánů, potraty, rakovinou, neplodností a časnější menopauzou [Hatch et al., 2015].

Mezi léky s těmito účinky řadíme i některé psychiatrické léky jako jsou tricyklická antidepresiva [Berken et al., 1984; Fava, 2000] a lithium [Ricken et al., 2016], dále sem patří i glukokortikoidy, které ovlivňují metabolismus lipidů a glukózy [Yang et al., 2018], antiepileptika (kyselina valproová a jí příbuzné látky) a antidiabetika (insulin, deriváty sulfonylurey, thiazolidiony) [Verrotti et al., 2011].

Aditiva v potravinách

U glutamátu sodného bylo prokázáno, že jeho podávání v časném období po narození vede ke zvýšení poměru tuku k tělesné hmotnosti. Při studiu jeho účinku na pokusných myších bylo pozorováno dramatické zvýšení hladiny leptinu, což může vést ke vzniku insulinové rezistence [Matysková et al., 2008]. Glutamát sodný má také neurotoxické účinky, a poškozuje signalizaci leptinu a insulinu [Maletínská et al., 2006].

Ftaláty jsou těkavé estery kyseliny ftalové, které jsou používány jako rozpouštědla (ftaláty s nižší molekulární hmotností) a změkčovadla (ftaláty s vyšší molekulární hmotností) ke zvýšení pružnosti, průhlednosti a trvanlivosti plastových materiálů vyrobených hlavně z polyvinylchloridu [Darbre, 2017].

Jedná se o látky, které jsou schopné ovlivňovat produkci testosteronu, folikulostimulačního hormonu (FSH) nebo insulin-like růstového faktoru 3 (IGF-3), čímž mohou narušit funkční a strukturální vývoj mužských pohlavních znaků a poškodit plodnost [Mráz et al., 2016].

Ftaláty s vyšší molekulární hmotností mohou zvyšovat riziko vzniku alergií a astmatu, poškozovat funkce ledvin a jater [Benjamin et al., 2017].

Je pravděpodobné, že ftaláty zasahují i do vývoje abdominální obezity a DM2T, a to nejspíše mechanismem interakce s receptory PPARA a PPARG (receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem), které se podílejí na regulaci diferenciací adipocytů a dalších dějů, které souvisejí s metabolismem glukózy a lipidů [Mráz et al., 2016].

V plynné podobě jsou ftaláty uvolňovány do prostředí, kde se hromadí ve vzduchu i v prachu, s nímž se pak při dýchání dostávají do lidského těla. Pokud by došlo k přímému kontaktu výrobku se sliznicí, ftaláty se vstřebávají přímo do krve. Jsou schopné procházet i skrz placentární bariéru. Jejich biologický poločas je řádově hodiny až dny, takže se v těle neakumulují. Jsou rychle hydrolyzovány a jejich metabolity jsou pak detekovatelné v moči a v mateřském mléku [Høyer et al., 2018]. Nacházíme je v mnoha výrobcích, jako jsou barvy, obaly, zdravotnické pomůcky, dětské hračky, elektronika, podlahové krytiny, výrobky osobní hygieny (parfémy, deodoranty, šampóny, tělová mléka), osvěžovače vzduchu, textil [Mráz et al., 2016].

Celá řada ftalátů je uvedena v seznamu Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD) z roku 2004 o chemikáliích s vysokým objemem výroby. Jedná se o látky, které mají vlastnosti endokrinních disruptorů a některé jsou Evropskou unií zcela zakázané, a to především ftaláty v dětských hračkách a v potravinových obalech [Darbre, 2017].

Bisfenol A (BPA) byl připraven v roce 1891 ruským chemikem Alexandrem P. Dianinem jako potenciální syntetický estrogen. Místo něho se však nakonec uplatnil diethylstilbestrol se silnějším estrogením účinkem [Mráz et al., 2016].

Jedná se o jednu z nejrozšířenějších chemikálií ve světě [Cuomo et al., 2017]. Používá se při výrobě polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic. Je všudypřítomný ve spotřebních výrobcích, jako jsou tvrdé lahve na vodu, obložení vodovodního potrubí, nátěrové hmoty na potravinářské a nápojové plechovky, termopapír a zubní plomby [Darbre, 2017].

Jeho endokrinní efekt ovlivňuje zejména vývoj pohlavních orgánů a celkové reprodukční zdraví. Má však zřejmě roli i při rozvoji obezity a DM2T. Chronická expozice bisfenolu A vedla u pokusných zvířat k hyperinsulinemii a snížení insulinové senzitivity [Mráz et al., 2016].

Parabeny (alkylestery kyseliny p-hydroxybenzoové) se používají jako antimikrobiální činidla (konzervanty) pro uchování výrobků osobní hygieny, potravin, farmaceutických výrobků a výrobků z papíru. Jsou přítomné v lidských tkáních včetně prsní tkáně a mají estrogení vlastnosti [Darbre, 2017]. Parabeny podporují adipogenní diferenciaci z mesenchymálních buněk na úkor diferenciaci v osteocyty a chondrocyty [Hu et al., 2017].

1.4.3 Perzistentní organické polutanty (POP)

Tato skupina látek zde bude probrána podrobněji než ostatní látky s obezogením účinkem, protože souvisí s praktickou částí této práce.

Přehled a vlastnosti perzistentních organických polutantů

Perzistentní organické polutanty (tabulka 7 a 8) jsou toxické látky vznikající jako vedlejší produkty průmyslové výroby. Často vznikají dokonce neúmyslně bez následného praktického využití. Jsou perzistentní, tzn. odolné vůči degradaci, která je v životním prostředí velmi pomalá – poločas rozpadu v půdě se pohybuje řádově od několika po desítky let. Produkty vzniklé jejich rozkladem jsou ale rovněž často toxické. Jedná se o látky lipofilní povahy, které jsou transportovány krví ve vazbě na lipoproteiny a ukládány do tukové tkáně organismů. Vzhledem k jejich bioakumulačním vlastnostem jsou nejvíce ohroženy organismy na vrcholu potravního řetězce [Dvořáková, 2015].

Tabulka 7 - Skupiny látek patřící mezi perzistentní organické polutanty

Skupina	Příklady	Použití
Organochlorované pesticidy (OCP)	aldrin, chlordan, endrin, DDT, dieldrin, heptachlor, hexachlorbenzen, chlordekon, lindan, pentachlorfenol, mirex, toxafen a další	hubení škodlivých organismů (herbicidy, fungicidy, insekticidy); zakázané Stockholmskou konvencí
Polychlorované bifenyly (PCB)	směs 210 kongenerů, nejčastější PCB138, 153 a 180	široce využívané v průmyslu, elektroizolační vlastnosti, přísady do barviv, plastů; od roku 1984 výroba u nás zakázána
Polychlorované dibenzodioxiny (PCDD) a Polychlorované dibenzofurany (PCDF)	75 kongenerů 135 kongenerů	bez praktického využití, vznik jako vedlejší produkty výrob (PCDD při výrobě pesticidů; PCDF při výrobě PCB) a při spalování odpadu, lesních požárech, erupcích vulkánů
Polybromované bifenyly (PBB) a Polybromované difenylethery (PBDE)	hexabrombifenyl hexabromcyklododekan a další	zpomalovače hoření v textilních výrobcích, nábytku, elektronice a plastech

Tabulka 8 - Skupiny látek patřící mezi perzistentní organické polutanty

Skupina	Příklady	Použití
Organocínicité sloučeniny	tributylcín (TBT) trifenylcín (TPT) a další	biocidní látky používané v barvách aplikovaných na trupy lodí
Polychlorované n-alkany s krátkým a dlouhým řetězcem (SCCP a LCCP)	směs kongenerů a optických izomerů	používané od 80. let 20. století jako náhražka PCB
Perfluorkarboxylové kyseliny a jejich soli (PFCA)	kyselina perfluorooktanová (PFOA), perfluorooctansulfonylfluorid (PFOS)	použití jako obalové materiály pro potraviny, voděodolné oblečení, čisticí prostředky, barvy, laky a tmely, hasicí pěny
Polyaromatické uhlovodíky (PAU)	benzopyren dibenzoantracen	vedlejší produkty při spalování (výfukové plyny, cigaretový kouř, pečení, uzení a grilování masa, přírodní požáry)

Perzistentní organické polutanty v životním prostředí

Perzistentní organické polutanty se do ovzduší dostávají z průmyslových zdrojů, dopravy, ze skládek, používáním zemědělských postřiků a vypařováním z půdy. Vyskytují se zde ve formě par anebo vázané na prachové částice a kapičky vody. Podléhají velmi pomalé fotolýze vlivem slunečního záření. Na zemský povrch (do půdy) se dostávají buď usazováním popílku, aplikací pesticidů anebo s dešťovou vodou. Poměrně silně se váží na organickou složku půdy a jejich poločas rozpadu může být řádově roky až desítky let, přičemž na jejich rozkladu se podílejí hlavně mikroorganismy. Do vodních zdrojů jsou splachovány dešťovou vodou ze silnic a skládek, a s odpadní vodou z průmyslových závodů. Jejich největším rezervoárem jsou pak oceány, kde se ukládají v sedimentech, odkud se mohou znovu uvolňovat.

Vlivem jejich stability v ovzduší mohou být transportovány i tisíce kilometrů od původního zdroje a vyskytovat se tak i v oblastech, kde se nikdy nepoužívaly [Holoubek et al., 2001]. Tato skutečnost byla potvrzena analýzou ledu kolem severního pólu a rovněž tuku tammích živočichů [Villa et al., 2017].

V České republice byla provedena analýza půdních vzorků s cílem detekce reziduí vybraných pesticidů (chlordan, heptachlor, dieldrin, aldrin, endrin, isodrin, endosulfan I, endosulfan II, methoxychlor, mirex). Výsledky studie ukázaly, že i když se u nás ve velkém množství tyto druhy pesticidů nikdy nepoužívaly a byly ve světě už 20 let zakázané, přesto se vyskytovaly v půdě v horských i v zemědělských oblastech. Tato skutečnost dokazuje teorii šíření perzistentních organických polutantů pomocí atmosférických vlivů [Shegunova et al., 2007].

Cesty vstupu perzistentních organických polutantů do organismu a možnost ochrany před jejich působením

Rostliny mohou být znečištěny ochranným postřikem pesticidy anebo perzistentními organickými polutanty z ovzduší. Ty se pak mohou akumulovat v nadzemních částech rostlin obsahujících oleje a vosky.

Zvířata mohou být kontaminována převážně konzumací znečištěných rostlinných krmiv a rybí moučky, přičemž v potravním řetězci se koncentrace těchto látek zvyšuje směrem k vrcholovým predátorům včetně člověka, kteří jsou tak nejvíce ohroženi chronickou expozicí s následnými zdravotními komplikacemi [Holoubek et al., 2001].

Lidé jsou vystaveni těmto chemikáliím nejrůznějšími cestami. Hlavním zdrojem jsou potraviny živočišného původu (masné a mléčné výrobky, tučné ryby, vejce), dále uzené a grilované potraviny, nemyté ovoce a zelenina. Mezi další možné cesty vstupu do organismu patří inhalace (kouření, prach ve vnitřním prostředí, život ve znečištěných oblastech), dermální cesta (zejména při profesionální expozici a manipulaci s postřiky bez ochranných pomůcek) a rovněž transplacentární přenos [Neel a Sagris, 2011; Yang et al., 2017].

Při snaze o snížení tělesné hmotnosti se významně zvyšují sérové hladiny perzistentních organických polutantů v závislosti na množství shozených kilogramů. Kontaminující látky rozpustné v lipidech se při hubnutí uvolňují z tukové tkáně do krve, jsou v těle nově rozdělovány a jejich expozice může negativně ovlivnit zdraví [Malarvannan et al., 2018].

Dioxiny aktivují systém arylhydrokarbonový receptor - cytochrom p450 formu 1A1, vytvářejí oxidační stres a vyvolávají hyperkeratinizaci keratinocytů a sebocytů, což vede ke vzniku chlorakné. Bylo zjištěno, že některé přírodní látky, jako například cinnamaldehyd ze skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia*) a perillaldehyd z perily křovité (*Perilla frutescens*) tuto signalizaci inhibují a aktivují antioxidační děje. Tak zlepšují chlorakné u lidí zasažených dioxiny [Furue et al., 2018].

Morita et al. [2001] uvádí ve své práci výsledky s laboratorními potkany, kdy bylo potvrzeno, že přidavek chlorofylu z řasy *Chlorella pyrenoidosa* inhibuje absorpci

polychlorovaných dibenzodioxinů a polychlorovaných dibenzofuranů z gastrointestinálního traktu a urychluje jejich vylučování z těla se stolicí. Dioxiny byly detekovány rovněž v mateřském mléce, což by mohlo mít dopady na zdraví kojených dětí. Bylo zjištěno, že po užívání chlorelly v průběhu těhotenství byly hladiny dioxinů v mateřském mléce výrazně nižší, takže se snížil jejich přenos na dítě [Nakano et al., 2007].

Mechanismy působení obezogenních perzistentních organických polutantů v organismu

Jedná se o vysoce lipofilní látky, které se snadno ukládají v tukových kapénkách adipocytů tukové tkáně, ale i v dalších orgánech, které obsahují větší množství lipidů např. mozek a játra. Z těchto lokalit jsou v malých dávkách uvolňovány do krve, kde setrvávají navázané na lipidové částice [Yang et al., 2017], což způsobuje neustálou chronickou expozici.

Jednotlivé skupiny POP mohou působit různými mechanismy. Situaci komplikuje i skutečnost, že člověk je vystaven současnému působení nízkých hladin celé řady složitých směsí endokrinních disruptorů, které mezi sebou mohou interagovat aditivními, synergistickými nebo antagonistickými účinky, což znesnadňuje objasnění efektů těchto látek na metabolismus a zdraví [Mustieles et al., 2017].

Obezogeny mohou způsobovat přibývání na váze změnou lipidové homeostázy podporováním adipogeneze a akumulace tuků, a to několika mechanismy, jak je uvedeno v tabulce 9 [Darbre, 2017]. Na molekulární úrovni mohou obezogeny působit interakcí s jadernými transkripčními receptory jako jsou PPARA, PPARD a PPARG, s receptory steroidních hormonů a s aryluhlovodíkovým receptorem (AhR) [Darbre, 2017].

Tabulka 9 - Souhrn obezogenních účinků endokrinních disruptorů,
upraveno dle [Darbre, 2017]

Zvýšení počtu adipocytů (hyperplázie)
Zvýšení velikosti adipocytů (hypertrofie)
Změna endokrinní regulace vývoje tukové tkáně
Změna hormonů regulujících chuť k jídlu, pocity sytosti a stravovací preference (inhibice leptinu a stimulace ghrelinu – „hormonu hladu“ produkovaného buňkami trávicího traktu)
Změna rychlosti bazálního metabolismu
Změna energetické rovnováhy ve prospěch skladování kalorií
Změna insulinové senzitivity a lipidového metabolismu v endokrinních tkáních jako je tuková tkáň, játra, slinivka, mozek, gastrointestinální trakt a svaly

Jaderné transkripční receptory (PPAR) regulují biosyntézu a skladování lipidů, dále kontrolují proliferaci a diferenciaci preadipocytů v tukové tkáni. Obezogeny mění adipogenezi prostřednictvím interakce s PPARG [Darbre, 2017]. U organocínicích sloučenin, metabolitů ftalátů, parabenů a u polybromovaných bifenylnů bylo zjištěno, že působí jako agonisté PPARG, potlačují osteogenezi a diferenciaci multipotentních mesenchymálních buněk derivovaných z kostní dřene směrují přednostně k adipocytům [Watt a Schlezinger, 2015].

Expozice plodu nebo novorozence látkám, které napodobují signalizaci steroidních hormonů (např. fytoestrogeny, syntetický estrogen diethylstilbestrol, parabeny), je spojena s rozvojem obezity v pozdějším věku [Darbre, 2017]. Tyto látky rovněž poškozují normální embryonální vývoj a reprodukční funkce v dospělosti. Ovlivňují procesy zprostředkované estrogény nebo androgény napodobováním nebo antagonizací jejich fyziologických funkcí [Müllerová a Kopecký, 2007].

Aryluhlovodíkový receptor je lokalizován v cytoplazmě buněk mnoha tkání, včetně plic, jater, ledvin, kůže, sleziny a placenty. Je aktivován řadou lipofilních xenobiotických sloučenin difundujících přes plazmatické membrány a zprostředkovává biologické odpovědi na tyto látky, které je zapotřebí odstranit z těla, a to aktivací cytochromu P450 [Sorg, 2014]. Může nepřímo ovlivnit adipogenezi změnou exprese PPARG. Skrze tento mechanismus nejspíše fungují např. polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany [Darbre, 2017].

Studovány jsou i další možné mechanismy působení POP související s obezitou a DM2T. Jedním z nich by mohla být interakce s receptory thyroidních hormonů, které mají vliv na vývoj mozku a na bazální metabolismus [Darbre, 2017; Baba et al., 2018].

U rozvoje nemocí jako je obezita, DM2T a rakovina byla zjištěna souvislost také s mitochondriální dysfunkcí, rozvíjející se nejen v průběhu stárnutí, ale i po expozici dioxinům. Mitochondriální dysfunkce vede k akumulaci diacylglycerolu a dalších metabolitů z metabolismu mastných kyselin, což potlačuje insulinovou signální dráhu, a dále vede ke zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Tyto podmínky jsou běžně pozorované v insulin-rezistentních tkáních [Yang et al., 2017].

Patofyziologické účinky POP

Chronická expozice a akumulace těchto toxických látek v organismu může indukovat endokrinní dysfunkci, která se projevuje poruchami imunitních a reprodukčních funkcí, vznikem karcinomů, obezity, insulinové rezistence, DM2T, hypertenze a dyslipidemie. Po akutní expozici vzniká chlorakné nebo může docházet až k úmrtí jedince [Sorg, 2014; Yang et al., 2017].

Epidemiologické studie a asociace mezi perzistentními organickými polutanty, obezitou a diabetes

Epidemiologické studie zaměřené na tyto látky vycházejí z měření jejich obsahu v tuku a v séru. U koncentrací v tukové tkáni nacházíme menší variabilitu ve srovnání se sérovými koncentracemi, protože ty mohou být ovlivněny krátkodobou expozicí anebo mobilizací POP uložených v tukové tkáni [Mustieles et al., 2017]. Z těchto látek jsou nejčastěji a nejvíce zastoupené v tukové tkáni člověka organochlorované pesticidy a polychlorované bifenyly. Rozmezí hodnot těchto látek jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 - Obsah perzistentních organických polutantů v lidské tukové tkáni, upraveno dle [Achour et al., 2017; Malarvannan et al., 2013; Jimenez Torres et al., 2006]

Chemikálie	Rozmezí hodnot (ng/g tuku)
DDT (dichlordifenyiltrichlorethan) a jeho metabolity: DDE (dichlordifenyldichlorethylen) DDD (dichlordifenyldichlorethan)	20 – 9000
HCB (hexachlorbenzen) HCH (hexachlorhexan)	70 – 5500
PCB 138, 153, 180	10 - 300

V roce 1976 došlo k výbuchu v chemické továrně na herbicidy v italském Sevesu, kdy došlo k úniku do ovzduší prudce jedovaného dioxinu. Jde o nejznámější vystavení obyvatelstva dioxinům [Wesselink et al., 2014]. U dívek, které byly v době výbuchu mladší 12 let, se v dospělosti projevila obezita a cukrovka. To potvrzuje zjištění, že kritické pro rozvoj diabetes je vystavení se těmto chemikáliím v raném věku [Yang et al., 2017].

V jiné studii [Mustieles et al., 2017] byl sledován počet složek metabolického syndromu (DM2T, hypertenze, hypertriglyceridemie, nízký HDL cholesterol) ve vztahu k obsahu hexachlorhexanu a hexachlorbenzenu v tuku. Bylo zjištěno, že čím měl pacient vyšší naměřené hodnoty těchto látek v tuku, tím více složek metabolického syndromu měl.

Další zajímavý jev byl pozorován v Kanadě, kde se u původního národu vyskytuje 17,2% prevalence DM2T oproti 6,8 % u zbytku kanadské populace. Toto je dáváno do souvislosti

s vyšší konzumací ryb, které mohou obsahovat kontaminanty [Marushka et al., 2017]. Laboratorně byla tato skutečnost zjištěna již dříve u myši krmených nerafinovaným tukem z lososů, jejichž tuk obsahoval směs perzistentních organických polutantů. U zvířat došlo k rozvinutí insulinové rezistence, abdominální obezity a hepatosteatózy.

Ve studii Henríqueze-Hernándeze [2017], která byla prováděna na Kanárských ostrovech, bylo potvrzeno, že sérové hladiny těchto látek jsou významně vyšší u jedinců s diabetem než u nediabetiků. Přitom bylo pozorováno nejvyšší zastoupení látek DDE, PCB153 a PCB118.

Ochrana životního prostředí a zdraví

V květnu 2001 byla přijata Stockholmská úmluva o perzistentních organických polutantech, jejímž cílem je: „chránit lidské zdraví a životní prostředí před perzistentními organickými polutanty, zastavit produkci a používání těchto látek“. Úmluva byla ratifikována Evropskou unií a 179 zeměmi celého světa. Nejprve bylo na seznamu 12 látek, postupně jsou přidávány další, v současnosti je Stockholmskou úmluvou zakázáno 23 látek [Harrad, 2009]. Tato skutečnost ale neplatí absolutně, jelikož např. ačkoliv je DDT zakázané, některé země ho stále v omezeném množství používají k hubení malarických komárů [ARNIKA, 2014].

Státní orgány zajišťují vydávání právních dokumentů, které stanovují nejvyšší přípustné limity těchto látek nejen v životním prostředí, ale i v potravinách. Zákon o ovzduší, o vodě, půdě a související vyhlášky nařizují používání nejlepších možných technologií v zařízeních, která mohou být zdrojem těchto látek [Holoubek et al., 2001].

Ve vztahu k životnímu prostředí se provádí monitoring zdravotního stavu obyvatelstva [Ruprich, 2009].

2 HLAVNÍ A DÍLČÍ CÍLE

Tato práce si klade za cíl zhodnocení vlivu perzistentního organického polutantu DDE (dichlordifenyldichlorethylenu) na genovou expresi adipocytů.

Dílčí cíle:

1. diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk derivovaných z tukové tkáně (hADMSC) do adipocytů a charakterizaci tohoto procesu
2. studium vlivu DDE (dichlordifenyldichlorethylenu) na expresi genů lipidového metabolismu a genů insulinové signální dráhy v průběhu diferenciaci

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní kmenové buňky, které byly identifikovány v několika tkáních, např. kostní dřev, tuková tkáň, zubní pulpa, pupečnicková krev apod. [Wagner et al., 2005]. Jedná se o buňky schopné sebeobnovy a diferenciaci do adipocytů, osteoblastů, chondrocytů, myocytů, ale i beta buněk pankreatu. Mezi jejich další charakteristickou vlastností patří adherence k plastovému povrchu, vřetenovitý tvar buněk a přítomnost typických povrchových znaků jako CD105, CD90, CD73 a zároveň absence CD45, CD34, CD79a, CD14 a HLA II [Phinney a Prockop, 2007].

3.2 Kultivace mesenchymálních kmenových buněk

Pro tuto práci byla vybrána jako nejvhodnější lidská buněčná linie mesenchymálních kmenových buněk derivovaných z tukové tkáně (human adipose-derived mesenchymal stem cells, hADMSCs) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Jedná se o linii získanou při liposukci z podkožní tukové tkáně ženské dárkyně. Tento typ buněk poskytuje slibnou budoucnost v tkáňovém inženýrství a v regenerativní medicíně. Má velmi podobné fenotypové a funkční charakteristiky jako častěji používané mesenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřev, jejich výhodou však je možnost méně invazivního získání [De Francesco et al., 2015].

Mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně byly kultivovány v souladu s instrukcemi poskytnutými dodavatelem. Buňky byly vysazeny v počtu 1×10^5 do 6-jamkových destiček, případně v počtu 5000 do 96-jamkových destiček (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) a kultivovány v komerčně dostupném médiu MesenPRO RSTTM Medium s přídatkem růstového suplementu MesenPRO RSTTM Growth Supplement s redukováným množstvím séra (2%), 1% L-glutaminu a 1% Gentamicinu (vše Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Buňky byly kultivovány za standardních podmínek (teplota 37°C, 5% atmosféra CO₂). Kultivační médium bylo měněno každé 3 dny. Po dosažení 70 - 80% konfluencí byla zahájena diferenciací buněk.

3.3 Diferenciací mesenchymálních kmenových buněk v adipocyt

Po dosažení přibližně 70 - 80% konfluencí byly buňky promyty pomocí pufrovaného fyziologického roztoku (PBS) a bylo k nim přidáno komerční diferenciací médium StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit s přídatkem 1% Gentamicinu (vše Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Buňky byly diferencovány v maturované adipocyty po potřebě charakterizace procesu diferenciací po dobu 21 dní a pro potřebu

studia vlivu DDE 28 dní. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek (teplota 37°C, 5% atmosféra CO₂). Diferenciační médium bylo měněno každé 3 dny.

3.4 Fotodokumentace průběhu diferenciac

Buňky byly fotodokumentovány ve dnech 0, 4, 10 a 21 diferenciac za použití mikroskopu Olympus CKX41 s fotoaparátem Olympus E-600 s objektivem ZUIKO Digital ED 14-42 mm (Olympus, Tokio, Japonsko).

3.5 Barvení Oil Red O

Pro zvýraznění vznikajících tukových kapének v průběhu diferenciac byly buňky ve dnech 0, 4, 10 a 21 barveny pomocí Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Toto barvivo se používá k barvení a vizualizaci lokalizace tuků. Proniká do tukových kapének uvnitř adipocytu a barví je červenooranžovou barvou.

Pracovní roztok barviva byl připraven smícháním zásobního roztoku s destilovanou vodou v poměru 3:2. Buňky byly nejprve opláchnuty PBS roztokem a následně fixovány ve 4% pufovaném formaldehydu po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Následně byly buňky 3x opláchnuty destilovanou vodou a bylo přidáno barvivo Oil Red O na dobu 30 minut. Inkubace probíhala při pokojové teplotě. Poté byly buňky opět 3x opláchnuty destilovanou vodou. Dokumentace byla pořízena pod invertovaným mikroskopem Olympus CX41 (Olympus, Tokio, Japonsko) s digitální kamerou.

3.6 Kvantifikace akumulovaných lipidů

Množství akumulovaných lipidů bylo kvantifikováno pomocí extrakce barviva Oil Red O a jeho spektrofotometrickém změření. Nejprve byly buňky zafixovány a obarveny standardním protokolem pro barvení Oil Red O (viz kapitola 3.5). Poté byly buňky zlyzovány lyzačním roztokem (4% Nonidet™ P-40 v 100% isopropanolu - obojí Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). 100 µl extraktu z každého vzorku bylo přeneseno na 96-jamkovou destičku. Na destičkovém readeru SynergyHT (BioTek, Winooski, Vermont, USA) byla změřena absorbance při 490, 500, 510 a 520 nm.

3.7 Fluorescenční imunocytochemie

Tato metoda byla použita k průkazu přítomnosti diferencovaných adipocytů. Jako marker byl použit specifický protein fatty acid binding protein 4 (FABP4).

Fixace byla provedena 4% formaldehydem po dobu 60 min. při teplotě 4 až 8° C. Po opakovaném promytí roztokem PBS byly buňky permeabilizovány v 0,3% Tritonu X-100

po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po opětovném promytí byl k buňkám na 60 minut přidán blokační roztok (1% bovinní albumin v PBS). Inkubace probíhala za pokojové teploty. Všechny použité chemikálie byly součástí kitu Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit (Molecular probes, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). Po blokaci byly buňky inkubovány s primární protilátkou anti-FABP4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) přes noc při teplotě 4 až 8° C. Po oplachu byla přidána sekundární protilátka NL557-conjugated donkey anti-goat secondary antibody (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) na 60 minut. Inkubace probíhala při pokojové teplotě. K zamontování vzorku bylo použito DAPI ProLong Gold Antifade Mountant (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Vzorek byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem Olympus CX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko) připojeným k digitální kameře.

3.8 Viabilita buněk

Viabilita buněk v průběhu diferenciaci byla stanovena pomocí metody PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Toto činidlo obsahující resazurin je redukováno metabolicky aktivními buňkami za vzniku resorufinu, který je vysoce fluorescenční. Buňky byly diferencovány v 96-jamkových destičkách Nunc™ MicroWell™ Optical-Bottom Plates (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Ve dnech 0, 4, 10 a 21 bylo do každé jamky přidáno 10 µl činidla. Inkubace trvala 10 minut při pokojové teplotě ve tmě. Na destičkovém readeru SynergyHT (BioTek, Winooski, Vermont, USA) byla měřena fluorescence (excitace 560 nm, emise 590 nm). Vyšší hodnota fluorescence koreluje s vyšší celkovou metabolickou aktivitou buněk.

3.9 Distribuce mitochondrií v buňce

„Live Cell Imaging“ je progresivní metoda vhodná k výzkumu interakcí jednotlivých buněk, buněčných organel apod., kdy jsou buňky pozorovány živé a v reálném čase. Tato metoda byla použita k ozřejmění mitochondriální sítě v průběhu diferenciaci pomocí MitoTracker™ Red CMXRos a ke zvýraznění jádra za použití NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (oboje Molecular probes, Eugene, Oregon, USA).

MitoTracker™ je červené fluorescenční barvivo, které pasivně difunduje plazmatickou membránou a akumuluje se v aktivních mitochondriích. Jeho emisní maximum je při 599 nm. NucBlue™ obsahující barvivo Hoechst® 33342 dye (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) emituje při navázání na DNA modrou fluorescenci s emisním maximem při 460 nm. Je detekován modrým DAPI filtrem.

Kultivační médium bylo nahrazeno roztokem Live Cell Imaging Solution (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) pro získání jasnějšího obrazu. Na 1 ml média byly přidány dvě kapky NucBlue™ v konečné koncentraci 100 nM MitoTracker™. Buňky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut a pak vizualizovány kamerou Hamamatsu Orca-ER připojenou k invertovanému mikroskopu Olympus IX81 při 200x zvětšení (Olympus, Tokio, Japonsko).

3.10 Mitochondriální membránový potenciál

Pro doplnění informací o funkčním stavu buněk a jejich mitochondrií byl stanovován mitochondriální membránový potenciál, což je napětí na polarizované polopropustné membráně vznikající jako důsledek působení elektrochemického gradientu malých iontů a protonů. K tomu byl použit JC1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Mitosciences, Abcam, Cambridge, UK). Pomocí této lipofilní látky (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin jodid) je možné detekovat změny mitochondriální membrány. Zdravé buňky s funkčními mitochondriemi vykazují červenou fluorescence. Pokles této fluorescence signalizuje buněčné poškození.

Buňky byly vysazeny na 96-jamkové destičky Nunc™ MicroWell™ Optical-Bottom Plates v počtu 1×10^4 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Mitochondriální membránový potenciál byl měřen v den 0, 4, 10 a 21 diferenciaci ($n = 12$). Buňky byly nejprve opláchnuty PBS a následně inkubovány s JC-1 ($1 \mu\text{M}$) po dobu 10 minut při 37°C . Následně byly buňky opět opláchnuty a byla měřena jejich fluorescence při excitaci 475 nm a emisi 530/590 nm na spektrofotometru Synergy HT (BioTek, Winooski, Vermont, USA).

Pro ověření správnosti výsledků byl mitochondriální membránový potenciál měřen i pomocí průtokové cytometrie za použití MitoProbe™ JC-1 Assay kitu (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) v den 4 a 21 diferenciaci. Buňky byly resuspendovány ve vlažném (37°C) fosfátovém pufru. Výsledná koncentrace buněk byla přibližně 1×10^6 buněk/ml. K buňkám bylo přidáno barvivo JC-1 ($10 \mu\text{l}$ z $200 \mu\text{mol/l}$). Inkubace trvala 20 minut při 37°C a 5% CO_2 . Po oplachu PBS a centrifugaci (5 min, 1500 rpm) byly vzorky resuspendovány v $500 \mu\text{l}$ PBS a změřeny v průtokovém cytometru BD FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Analýza byla provedena softwarem BD FACS Diva. Pro vyhodnocení potenciálu mitochondriální membrány byl stanoven poměr intenzity červené / zelené fluorescence.

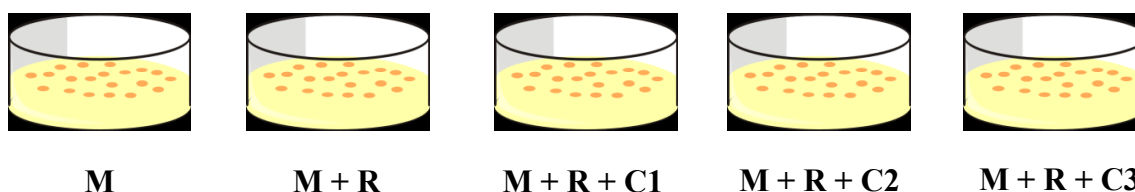
3.11 Ovlivnění adipocytů v průběhu jejich diferenciaci vybranými polutanty

V průběhu diferenciaci byly buňky chronicky exponovány perzistentnímu organickému polutantu dichlordifenyldichlorethylenu (DDE) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Důvodem výběru této látky je její vysoká koncentrace v okolním prostředí a tedy vysoká míra expozice pro člověka.

Polutant DDE byl rozpuštěn v triglyceridové složce roztoku NuTRIflex® Lipid peri (B. Braun, Melsungen, Germany), užívaného při humánní parenterální výživě. Důvodem rozpuštění polutantu v tomto roztoku bylo napodobení obezogenního prostředí, ve kterém žijeme. Výsledné koncentrace polutantu v kultivačním médiu byly 0,1 μM , 1 μM a 10 μM . Jedná se o hodnoty, které korelují s hodnotami nacházenými v lidském séru [Dirinck et al., 2014].

Při pokusu bylo celkově používáno pět typů diferenciací médií (obrázek 8):

- médium č. 1 – pouze čisté diferenciací médium (M)
- médium č. 2 – diferenciací médium s rozpouštědlem (R)
- médium č. 3 – diferenciací médium s perzistentním organickým polutantem s rozpouštědlem o finální koncentraci 0,1 μM (C1)
- médium č. 4 – diferenciací médium s perzistentním organickým polutantem s rozpouštědlem o finální koncentraci 1,0 μM (C2)
- médium č. 5 – diferenciací médium s perzistentním organickým polutantem s rozpouštědlem o finální koncentraci 10 μM (C3)



Obrázek 8 – Rozdělení buněčných kultur podle složení diferenciacího média

Legenda: M = diferenciací médium; M+R = diferenciací médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciací médium s DDE o $c = 0,1 \mu\text{M}$; C2 = diferenciací médium s DDE o $c = 1 \mu\text{M}$; C3 = diferenciací médium s DDE o $c = 10 \mu\text{M}$.

V průběhu procesu diferenciacce byly ve dnech 0, 4, 10, 21 a 28 odebírány vzorky pro kvantitativní stanovení mRNA pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

3.12 Kvantitativní stanovení exprese mRNA vybraných genů pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR)

Stanovení exprese mRNA vybraných genů (tabulka 11, 12) bylo provedeno metodou RT-PCR s UPL sondou (Universal Probe Library, Roche). Celková RNA byla izolována z pelety buněk za pomoci kitu FastRNAPro Green Kit (QBIogene, Irvine, CA, USA). Reverzní transkripce byla provedena z 250 ng celkové RNA reverzní transkriptázou Superscript III (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) za použití random hexamerů jako primerů. Sekvence primerů a odpovídající sondy byly generovány softwarem ProbeFinder (Roche, Mannheim, Germany). Primery byly syntetizovány firmou East Port Praha (Praha, ČR) [Müllerová et al., 2016].

Kvantitativní stanovení bylo provedeno na přístroji Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). U všech vzorků byla hodnocena exprese referenčních genů: β -glukuronidázy (GUSB), hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (HPRT) a tyrozin 3/tryptofan 5-monooxygenázou aktivovaného proteinu zeta (YWHAZ). Výsledky jsou vyjádřeny jako normalizované hodnoty ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ algoritmus) vztažené ke geometrickému průměru kvantifikace (C_t) tří referenčních genů [Pešta et al., 2018].

Tabulka 11 - Sledované referenční geny a geny monitorující diferenciaci,
upraveno dle [Pešta et al., 2018]

Symbol a název genu	Funkce
<i>Referenční geny</i>	
GUSB (glucuronidase beta)	lysosomální rozklad glykosaminoglykanů
HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)	regenerace nukleotidů z příslušných purinových nukleových bází
YWHAZ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta)	adaptér pro regulaci přenosu signálu, interaguje s proteinem IRS1 (úloha při regulaci citlivosti na insulin)
<i>Monitoring diferenciaci</i>	
OCT4 (organic cation/carnitine transporter4)	transkripční faktor zapojený v samoobnově nediferencovaných embryonálních kmenových buněk
PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	regulace diferenciaci adipocytů; regulace skladování mastných kyselin a metabolismu glukózy
PPARGC1B (PPARG coactivator 1 beta)	stimulátor některých transkripčních faktorů a aktivit jaderných receptorů; je snížen u pacientů prediabetických a s DM2T

Tabulka 12 - Sledované geny regulace metabolismu glukózy a lipidů,
upraveno dle [Pešta et al., 2018]

Symbol a název genu	Funkce
<i>Metabolismus adipocytů a jeho regulace</i>	
INSR (insulinový receptor)	receptor tyrosinkinázy zprostředkávající účinky insulinu; vazba insulinu na receptor aktivuje insulinovou signální dráhu regulující příjem a uvolňování glukózy a syntézu a skladování sacharidů, lipidů a bílkovin
AKT2 (AKT serin/threonin kináza 2)	funkce v signální transdukci aktivovaného insulinového receptoru; reguluje metabolismus, proliferaci, přežití buněk, růst a angiogenezi; nadměrná exprese přispívá k malignímu fenotypu karcinomu pankreatu
FASN (syntáza mastných kyselin)	multifunkční protein syntézy mastných kyselin; katalyzuje syntézu palmitátu z acetyl-CoA a malonyl-CoA v přítomnosti NADPH
ACLY (ATP citrát lyáza)	enzym zodpovědný za syntézu cytosolového acetyl-CoA potřebného pro lipogenezi a cholesterologenezi
LIPE (hormon-senzitivní lipáza typ E, HSL)	hydrolýza triglyceridů na volné mastné kyseliny

3.13 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA). Po testování normality distribuce byla data porovnána pomocí Studentova t-testu nebo jednosměrné ANOVA s Tukeyho post-hoc testem. Hodnoty $p \leq 0,05$ byly považovány za významné.

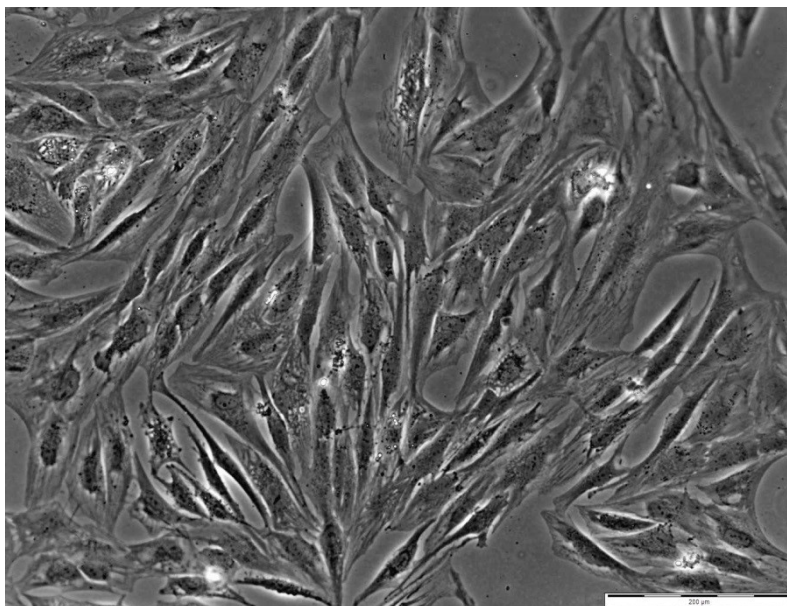
Statistické hodnocení naměřených údajů RT-PCR bylo provedeno pomocí statistického software Matlab Statistics Tool Box verze R 2012a pro Windows. Statistická významnost byla hodnocena jako $p \leq 0,05$. Využito bylo dle konkrétní situace jak neparametrického Wilcoxonova dvoustranného párového testu, tak neparametrického Friedmanova testu.

4 SOUHRN VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE

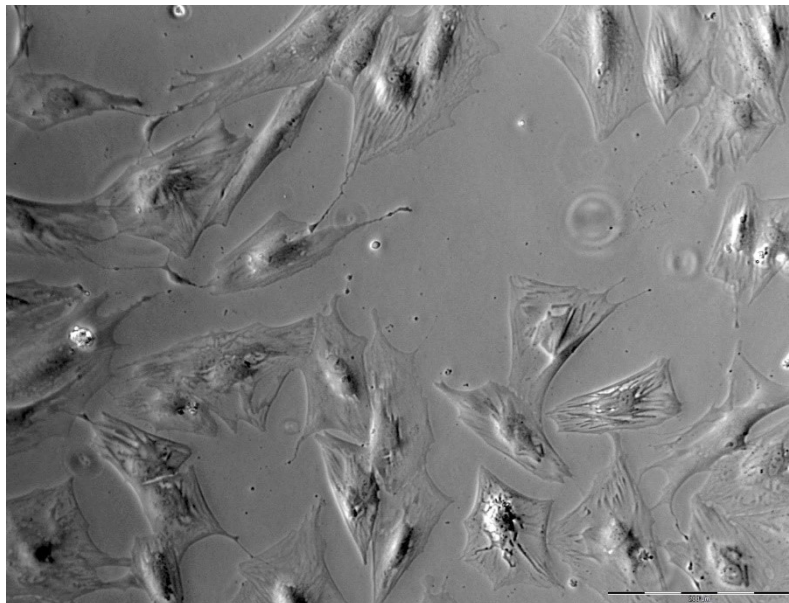
4.1 Výsledky a diskuze vztahující se k cíli 1

Diferenciace mesenchymálních kmenových buněk v adipocyt

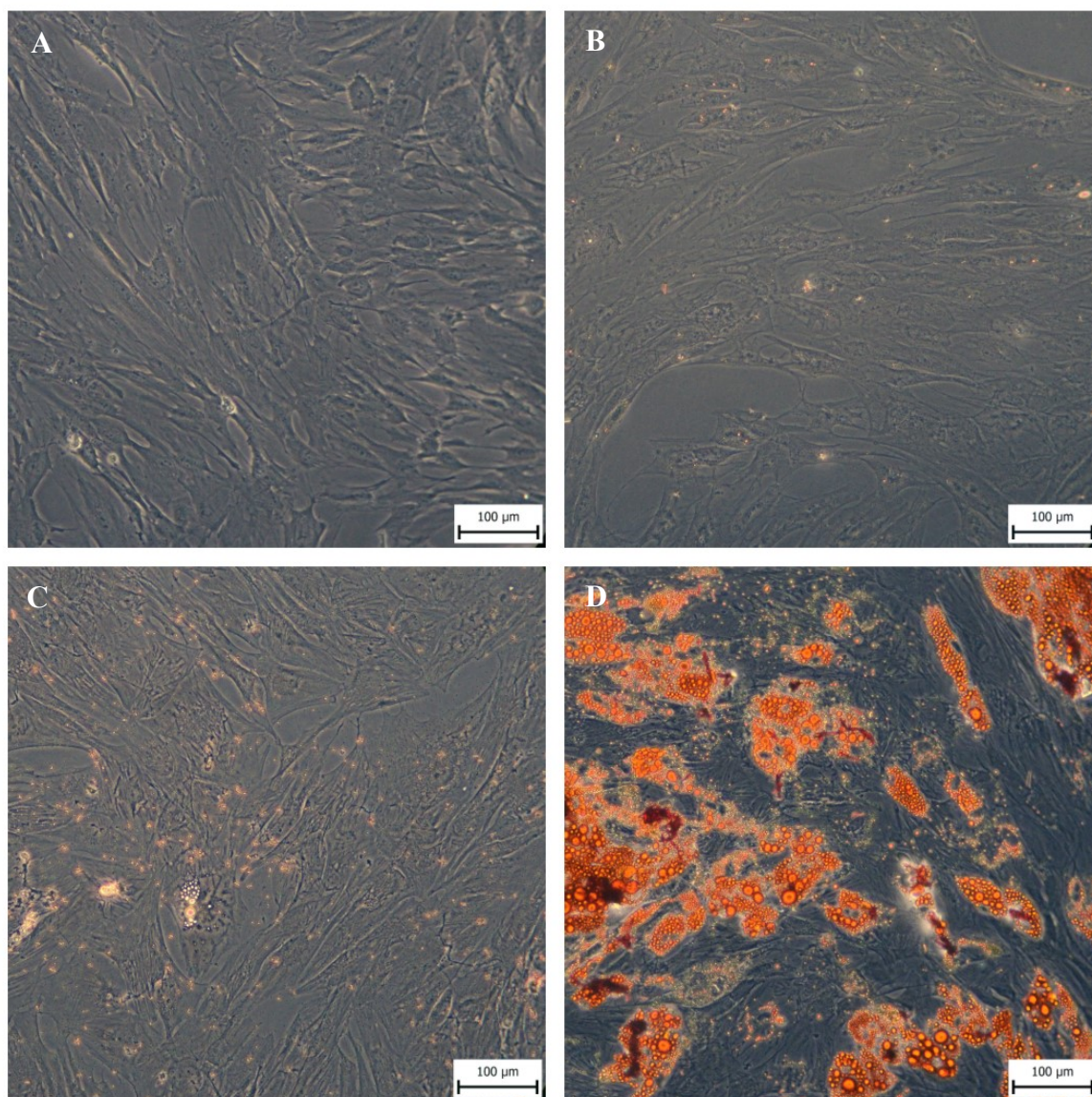
V den 0 diferenciace, tedy ještě ve stavu neovlivněných mesenchymálních kmenových buněk, byl pozorován typický vřetenovitý tvar (obrázek 9 a 10) těchto buněk a nebyly přítomny ještě žádné tukové kapénky (obrázek 11A). Postupně docházelo v buňkách k hromadění tuku ve formě drobných tukových kapének (obrázek 11B a 11C). Přibližně od 10. dne diferenciace docházelo k jejich postupnému množování a zvětšování. V maturovaných adipocytech (21. den) byly již patrné velké tukové kapénky, které vyplňovaly značnou část buňky (obrázek 11D). Jedné velké tukové kapénky, která je typická pro *in vivo* bílý adipocyt se však v průběhu *in vitro* diferenciace nepodařilo dosáhnout. To je ale společný problém, týkající se všech *in vitro* studií s diferenciací mesenchymálních kmenových buněk do adipocytů [Karahuseyinoglu, 2008]. Pro lepší viditelnost obsahu tuku uvnitř buněk byly buňky nabarveny pomocí barviva Oil Red O.



Obrázek 9 - Mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně (objektiv 10x)



**Obrázek 10 - Mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně
(objektiv 10x)**

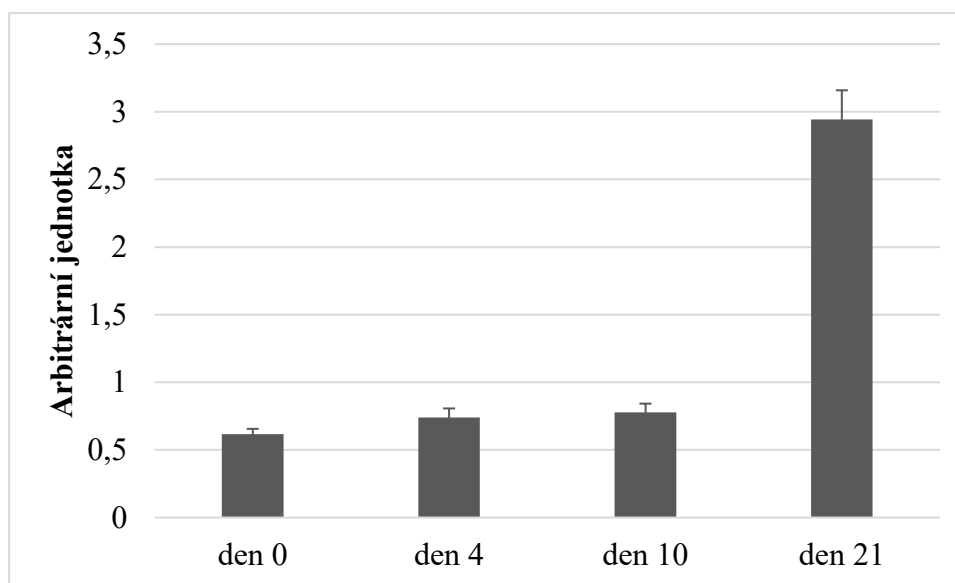


Obrázek 11 - Změny obsahu tukových kapének v průběhu diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk derivovaných z tukové tkáně

Legenda: **11A** - Nediferencované mesenchymální kmenové buňky. **11B** - 4. den diferenciaci. **11C** - 10. den diferenciaci. **11D** - Maturované adipocyty 21. den diferenciaci (tukové kapénky jsou obarveny barvivem Oil Red O; objektiv 20x).

Kvantifikace akumulovaných lipidů

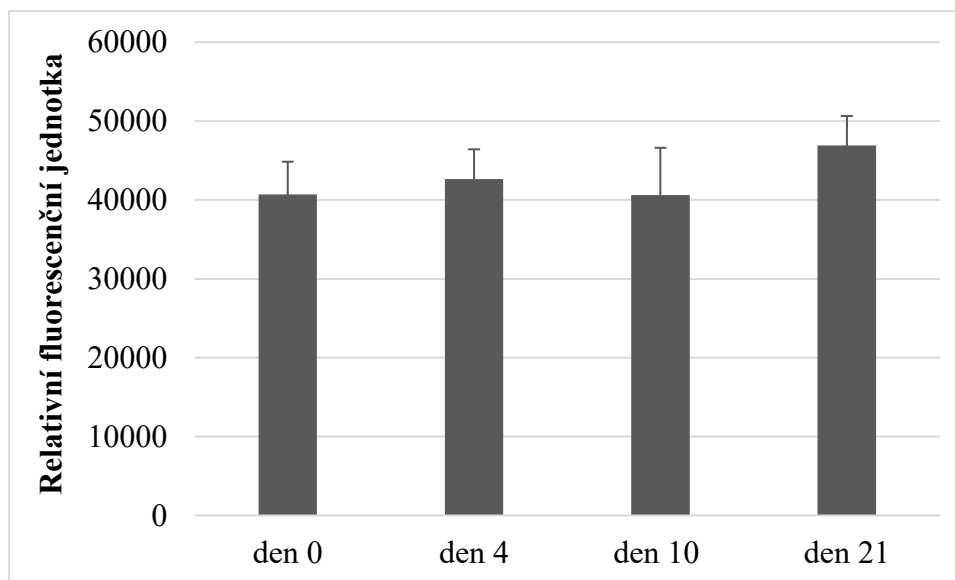
Množství přítomného barviva Oil Red O bylo spektrofotometricky kvantifikováno. Na obrázku 12 je patrný prudký nárůst akumulovaného tuku a tedy i nahromadění Oil Red O barviva v druhé polovině diferenciaci (od 10. dne). Byla nalezena statisticky významná rozdílnost mezi množstvím barviva v buňkách v 21. den diferenciaci vůči ostatním dnům (0, 4 a 10).



Obrázek 12 - Kvantifikace lipidů uvnitř buněk v průběhu diferenciaci

Viabilita buněk

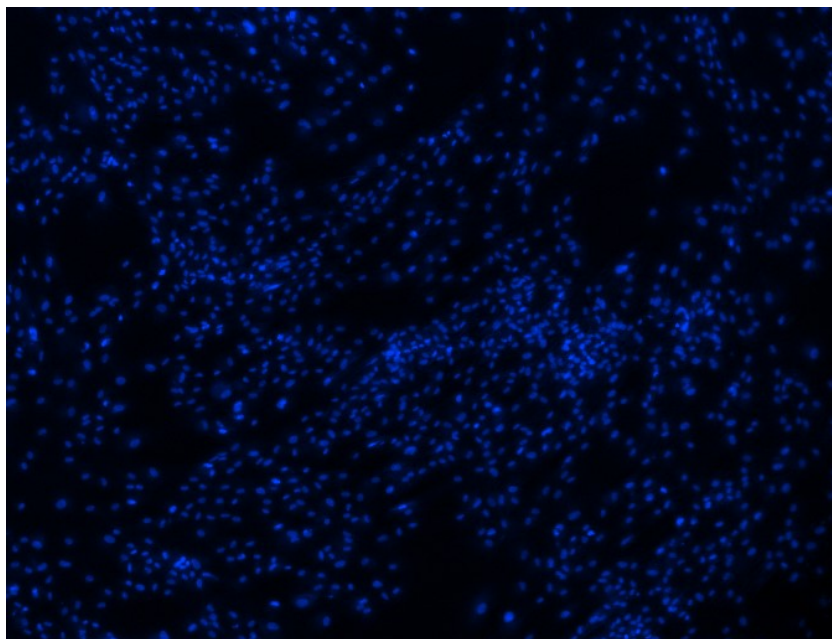
Kromě množství akumulovaných lipidů byla v průběhu diferenciaci sledována i viabilita buněk pomocí metody Presto blue, jejímž principem je redukce modrého nefluorescenčního resazurinu na růžový fluorescenční resorufin mitochondriálními enzymy [Zalata et al., 1998]. Viabilita byla měřena v den 0 ($40691,5 \pm 4153,14$ relativních fluorescenčních jednotek, RFU), 4 ($42660,75 \pm 3755,62$ RFU), 10 ($40616,95 \pm 5989,70$ RFU) a 21 ($46889,95 \pm 3756,07$ RFU). V průběhu diferenciacního procesu nebyla prokázána statisticky významná rozdílnost ve viabilitě buněk. Souhrnné výsledky zobrazuje obrázek 13.



Obrázek 13 - Viabilita buněk v průběhu diferenciaci měřená pomocí metody PrestoBlue

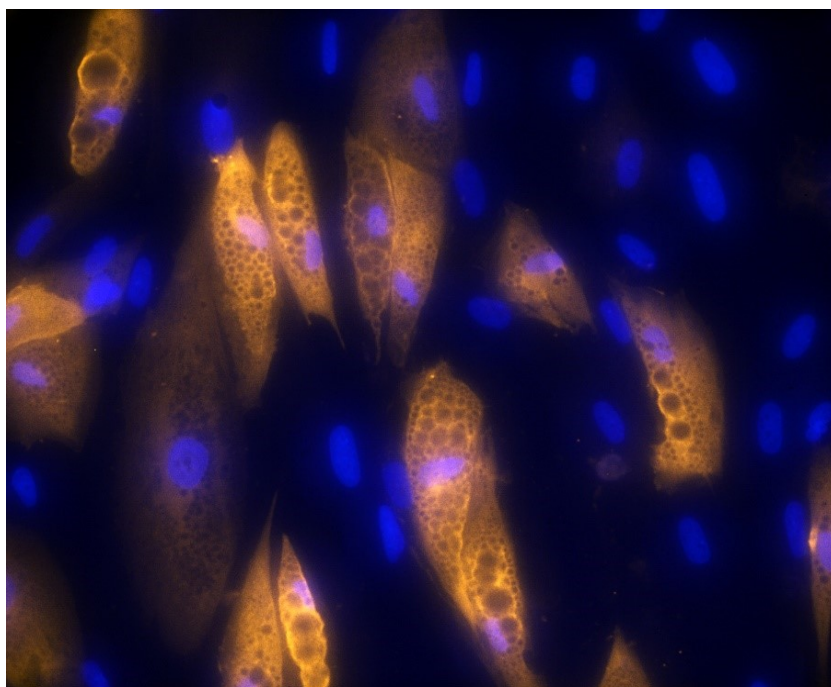
Fluorescenční imunocytochemie

Jako marker zralosti adipocytů byl zvolen protein FABP4 (FABP – fatty acids binding proteins). Jeho přítomnost byla prokázána pomocí fluorescenční imunocytochemie u diferencovaných buněk, naopak na začátku diferenciaci nebyla jeho přítomnost detekována (obrázek 14 a 15).



Obrázek 14 – Imunofluorescenční průkaz proteinu FABP4 v den 0 diferenciacie

Legenda: modrá barva – jadra; žlutá barva – FABP4 (Objektiv 4x).

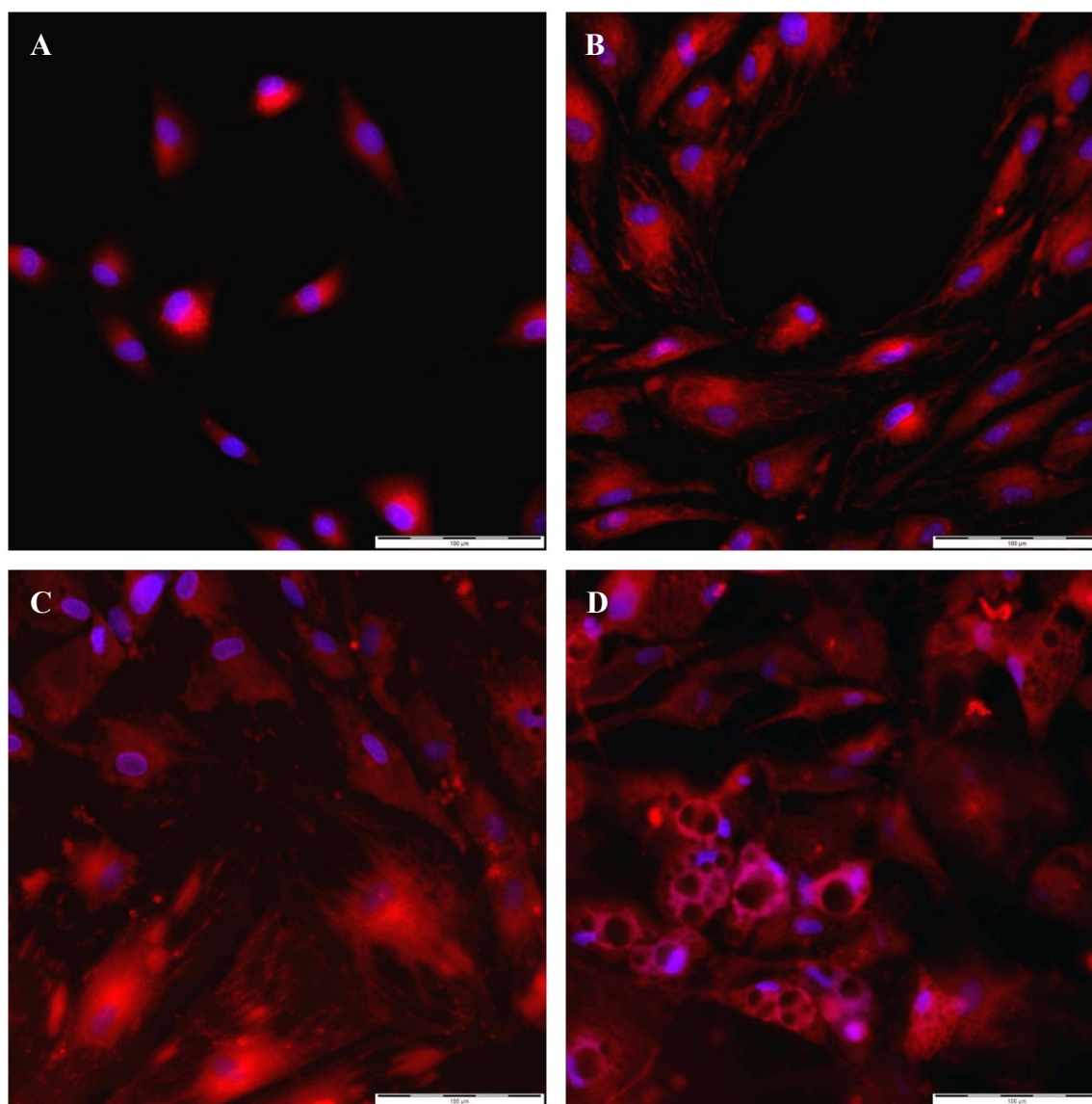


Obrázek 15 – Imunofluorescenční průkaz proteinu FABP4 v den 21 diferenciacie

Legenda: modrá barva – jadra; žlutá barva – FABP4 (Objektiv 40x).

Distribuce mitochondrií v buňce

V průběhu diferenciaci docházelo ke změně distribuce mitochondrií uvnitř buněk. V nediferencovaných buňkách vytvářely mitochondrie síť provazcovitého vzhledu s centrem u jádra, naproti tomu u diferencovaných buněk byly mitochondrie soustředěny zejména u jádra a tukových kapének (obrázek 16).



Obrázek 16 - Mitochondriální síť zvýrazněná pomocí barviva MitoTracker™

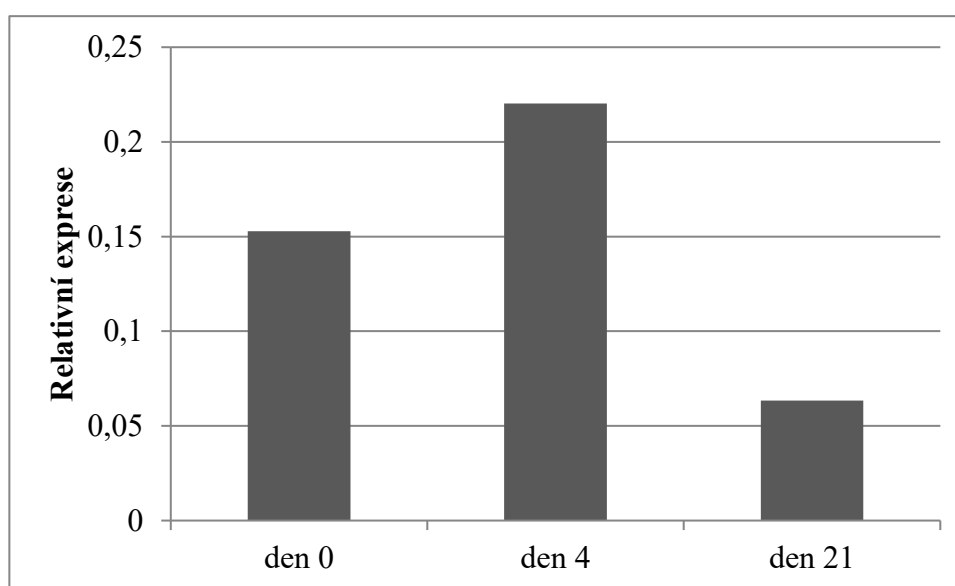
Legenda: **16A** Distribuce mitochondrií u nediferencovaných mesenchymálních kmenových buněk. **16B - D** Změny distribuce a množství mitochondrií v den 4, 10 a 21 diferenciaci. (Objektiv 20x).

Mitochondriální membránový potenciál

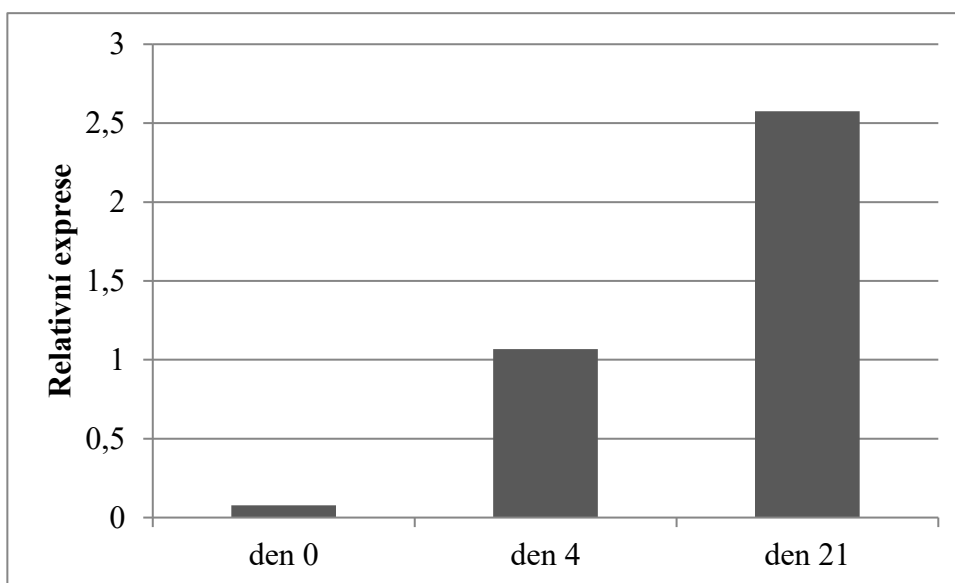
K monitoraci funkčního stavu mitochondrií bylo použito stanovení mitochondriálního membránového potenciálu pomocí barviva JC-1 a to spektrofotometricky a průtokovou cytometrií. Nízký mitochondriální membránový potenciál je charakterizovaný zelenou fluorescencí a vysoký potenciál naopak červenou. Výsledkem toho je, že k mitochondriální depolarizaci vede pokles intenzity poměru červené/zelené fluorescence. V průběhu diferenciaci byl pozorován postupný pokles tohoto poměru a to u spektrofotometrického stanovení (poměr 1,55 v den 4 a 0,24 v den 21) i pomocí průtokové cytometrie (poměr 3,19 v den 4 a 2,33 v den 21).

Kvantitativní stanovení mRNA vybraných genů pomocí RT-PCR

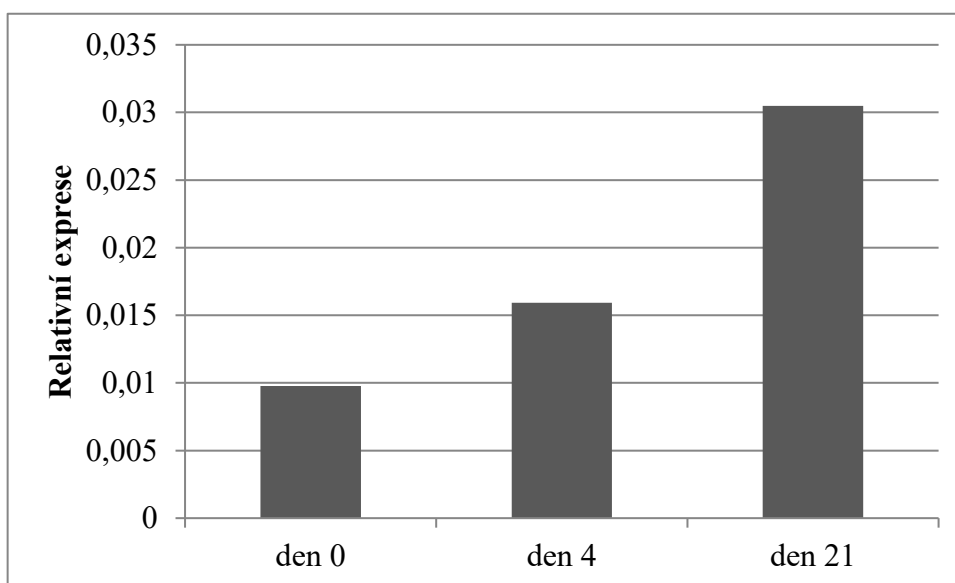
U genu OCT4 monitorujícího nediferencovaný stav buněk byl pozorován pokles exprese u 21. dne diferenciaci oproti dnu 0 a 4 (obrázek 17). Opačný trend byl pozorován u genů PPARG a PPARGC1B monitorujících diferenciaci. U těchto genů docházelo k postupnému zvyšování míry exprese (obrázek 18 a 19). Stejný trend byl pozorován i u genů souvisejících s metabolismem glukózy a lipidů (obrázek 20, 21 a 22).



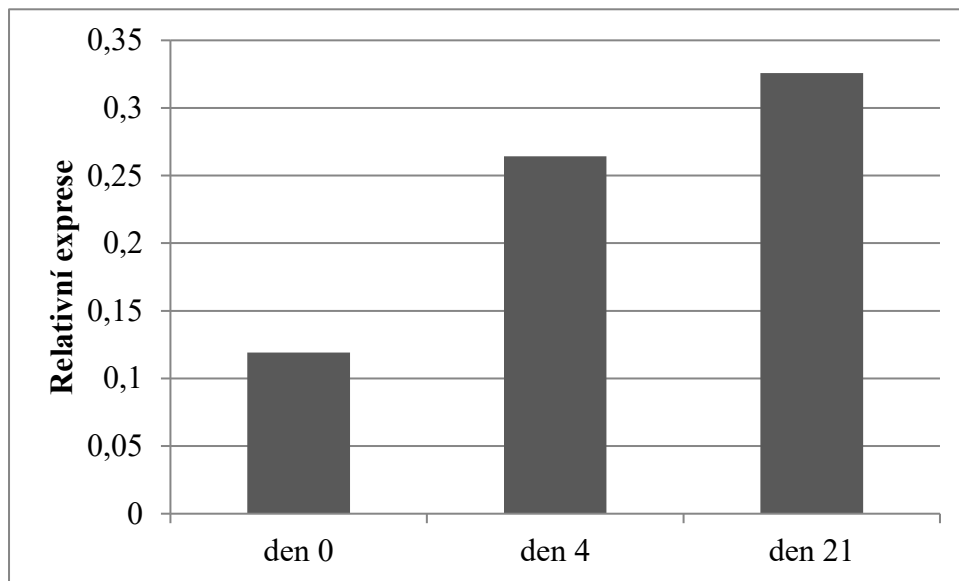
Obrázek 17 - Změny exprese genu OCT4 v průběhu diferenciaci



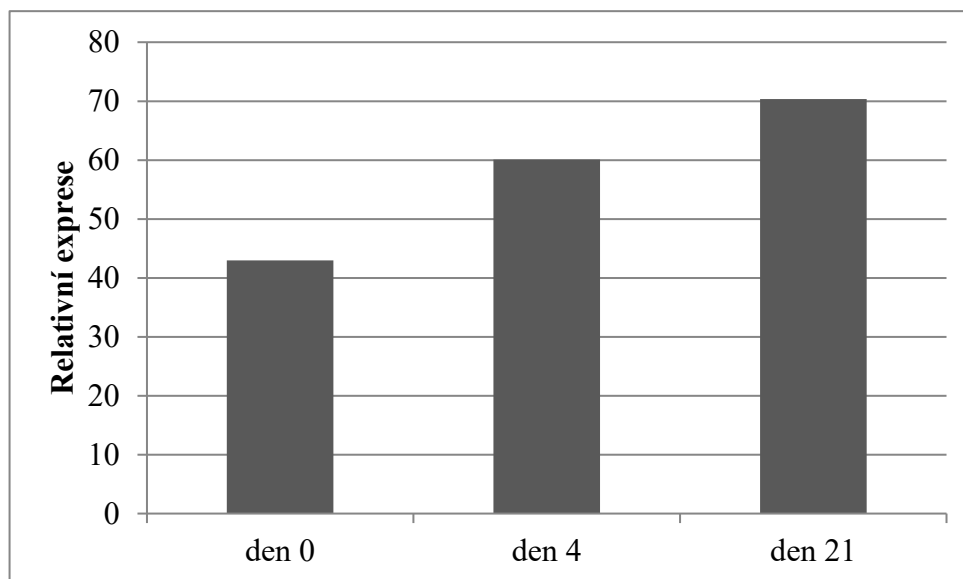
Obrázek 18 - Změny exprese genu PPARG v průběhu diferenciacce



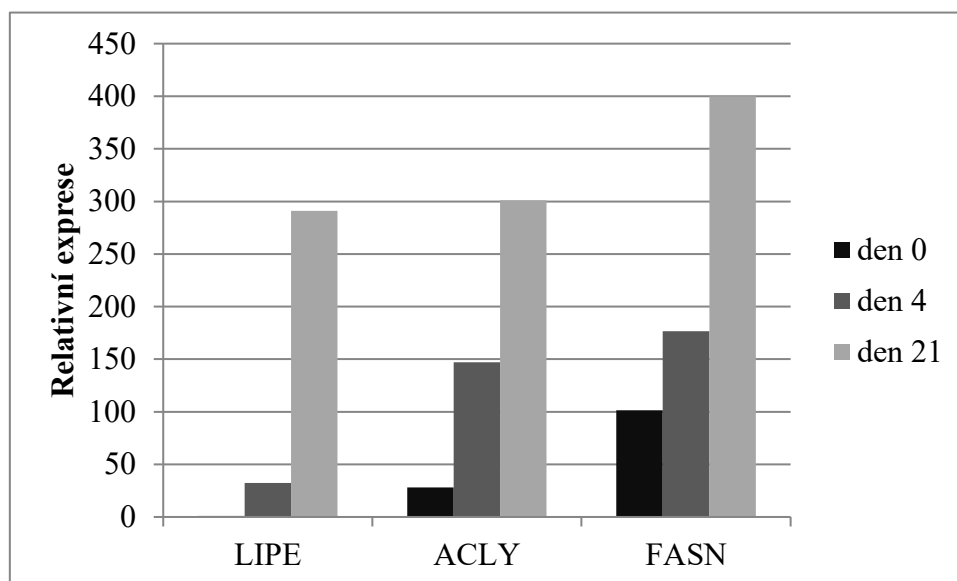
Obrázek 19 - Změny exprese genu PPARGC1B v průběhu diferenciacce



Obrázek 20 - Změny exprese genu INSR v průběhu diferenciacce



Obrázek 21 - Změny exprese genu AKT2 v průběhu diferenciacce



Obrázek 22 - Změny exprese genů LIPE, ACLY a FASN v průběhu diferenciacce

Diskuze

Proces diferenciacce mesenchymálních kmenových buněk derivovaných z tukové tkáně byl sledován po dobu 21 dní. V průběhu tohoto procesu byly hodnoceny morfologické změny buněk, jejich tvar, akumulované množství lipidů, viabilita, distribuce mitochondrií v buňce, mitochondriální membránový potenciál a změny genové exprese.

V průběhu diferenciacce došlo ke změně morfologie buněk a od 10. dne i k akumulaci lipidů. Toto potvrzují i četné publikace, které rozdělují diferenciaci adipocytů do jednotlivých fází. Na začátku diferenciacce dochází ke ztrátě vřetenovitého tvaru a k synchronizování buněčného cyklu buněk, poté následuje ještě mírné mitotické zmnožení buněk. Poslední fází v průběhu diferenciacce je již zmíněná akumulace tuků a formování tukové kapénky [Tang a Lane, 2012]. U zralých adipocytů byla prokázána přítomnost FABP4 proteinu, což je člen skupiny proteinů vázajících mastné kyseliny, jejichž společnou úlohou je absorpce, intracelulární transport a regulace metabolismu mastných kyselin. U proteinu FABP4 se předpokládá, že hraje klíčovou úlohu v již zmiňovaném transportu mastných kyselin, nejspíše aktivuje hormon-senzitivní lipázu a tím napomáhá regulaci lipolýzy [Shen et al., 1999]. Při zánětu tukové tkáně se jeho množství synergicky zvyšuje s leptinem, který stimuluje oxidaci mastných kyselin a snižuje jejich celkový příjem. S leptinem tak mají opačnou roli [Gan et al., 2015].

V průběhu diferenciacce mají důležitou roli mitochondrie. Postupně dochází k zvyšování jejich počtu. Důvodem je nejspíše to, že kmenové buňky využívají při tvorbě ATP na rozdíl od diferencovaných buněk přednostně glykolýzu a rovněž mají menší spotřebu

energie než diferencované buňky, z toho důvodu nejsou pravděpodobně tolik závislé na funkčních mitochondriích [Drehmer et al., 2016]. Avšak po zahájení diferenciaci a v jejím průběhu dochází k nárůstu potřeby energie. Tato změna je kompenzována zvýšenou mitochondriální biogenezí. Zdá se, že zvýšená mitochondriální biogeneze je obecným znakem diferencovaných buněk [Hofmann et al., 2012]. Kromě změny v počtu mitochondrií, dochází i ke změně jejich distribuce uvnitř buňky. Tato zjištění potvrzují i další práce zabývající se touto tematikou [Wilson-Fritch et al., 2003]. Významné změny u mitochondrií byly pozorovány díky stanovení mitochondriálního membránového potenciálu. Diferenciaci buněk vedla ke stavu depolarizace, což je nejspíše způsobeno nárůstem exprese rozpráhujících proteinů UCP1, UCP2 a UCP3. K jejich zvýšené expresi dochází vlivem nárůstu regulátoru mitochondriální biogeneze PPARGC1B [Zhang et al., 2013].

Multipotentní stav mesenchymálních kmenových buněk a jejich schopnost diferencovat v adipocyty jsou řízeny mnoha transkripčními faktory. Probíhající proces diferenciaci byl sledován analýzou exprese genů, které hrají důležitou roli v průběhu vývoje adipocytu z mesenchymální kmenové buňky. Byla analyzována exprese genu OCT4 udržujícího buňky v nediferencovaném stavu, genů řídících adipocytární diferenciaci – PPARG a PPARGC1B a genů ovlivňujících dráhu insulinového receptoru a metabolismu lipidů ve vztahu k insulinové rezistenci – INSR, AKT2, ACLY, LIPE a FASN.

OCT4 určuje nediferencovaný stav kmenových buněk. Je klíčovým regulátorem transkripce nejen v embryogenezi, ale také v somatických kmenových buňkách [Takahashi a Yamanaka, 2006].

PPARG je členem skupiny jaderných receptorů, což jsou transkripční faktory aktivované ligandem. Je vysoce exprimován v tukové tkáni a hraje ústřední roli v diferenciaci a zrání adipocytů [Hoepner, 2019]. Podílí se na patologii mnoha onemocnění, včetně obezity, diabetu, aterosklerózy a rakoviny [Corrales et al., 2018].

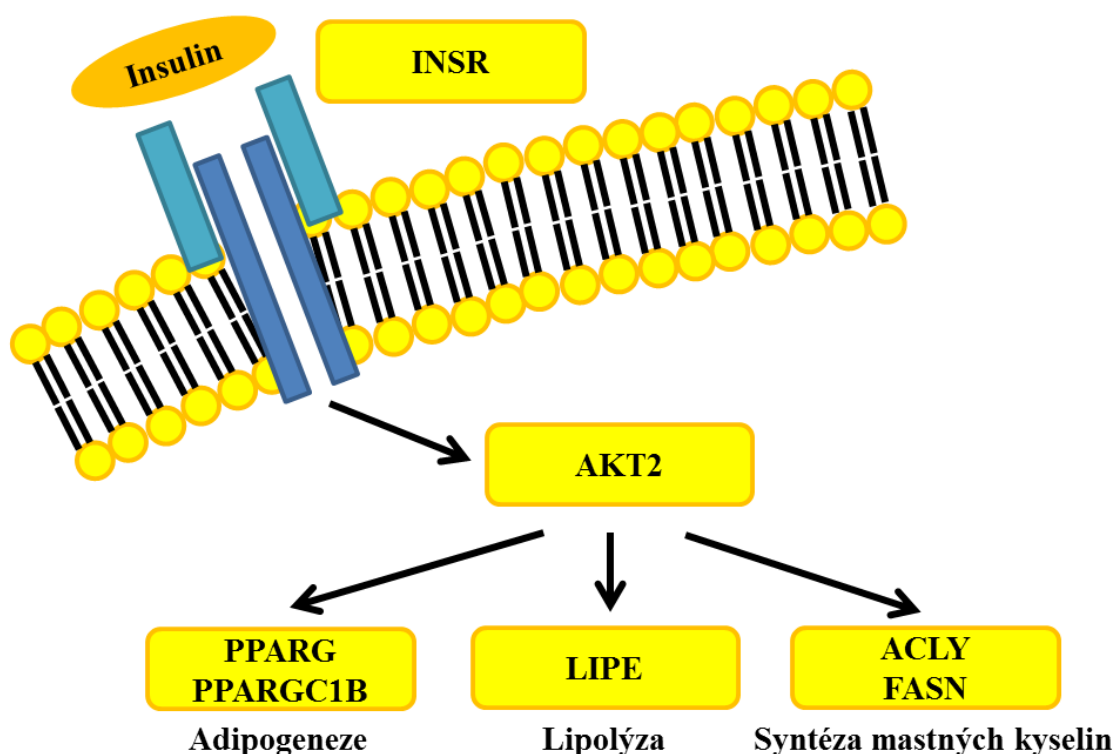
PPARGC1B je indukován během diferenciaci bílých a hnědých adipocytů. Reguluje mitochondriální oxidativní fosforylaci. Vysoce reaguje na environmentální podněty a některé variace v tomto genu mohou zvyšovat riziko rozvoje obezity a dalších metabolických patologií [Liu a Lin, 2011].

INSR je glykoprotein s aktivitou tyrosinkinázy umístěný na plazmatické membráně, jejímž prostřednictvím jsou řízeny účinky insulinu. Jeho aktivace vede k aktivaci AKT2 a dalších regulačních genů (obrázek 23). Hraje zásadní roli v adipogenezi v průběhu embryogeneze. V myším modelu buněk diferencujících v adipocyty s vyřazeným genem pro INSR dochází k chybné akumulaci tukových kapének a tak k chybné diferenciaci [Cignarelli et al., 2019].

FASN katalyzuje *de novo* syntézu mastných kyselin. Je exprimována v lipogenních tkáních. Běžně je exprese FASN v normálních buňkách nízká, protože buňky získávají potřebné mastné kyseliny spíše z diety než lipogenezí. Bylo zjištěno, že exprese se zvyšuje při nádorových onemocněních prostaty, prsu, tlustého střeva a plic. Kromě toho se FASN podílí na vzniku diabetu. Inhibitory FASN tak mohou potenciálně poskytovat možnost léčby některých nádorových onemocnění, obezity, DM2T a poruch jater [Abdel-Magid, 2015].

ACLY je enzym zodpovědný za tvorbu cytosolického acetyl-CoA, který vzniká ze sacharidů v mitochondriích a pro biosyntézu mastných kyselin musí být transportován do cytosolu. Tak ACLY spojuje metabolismus glukózy a syntézu mastných kyselin [Chypre, 2012].

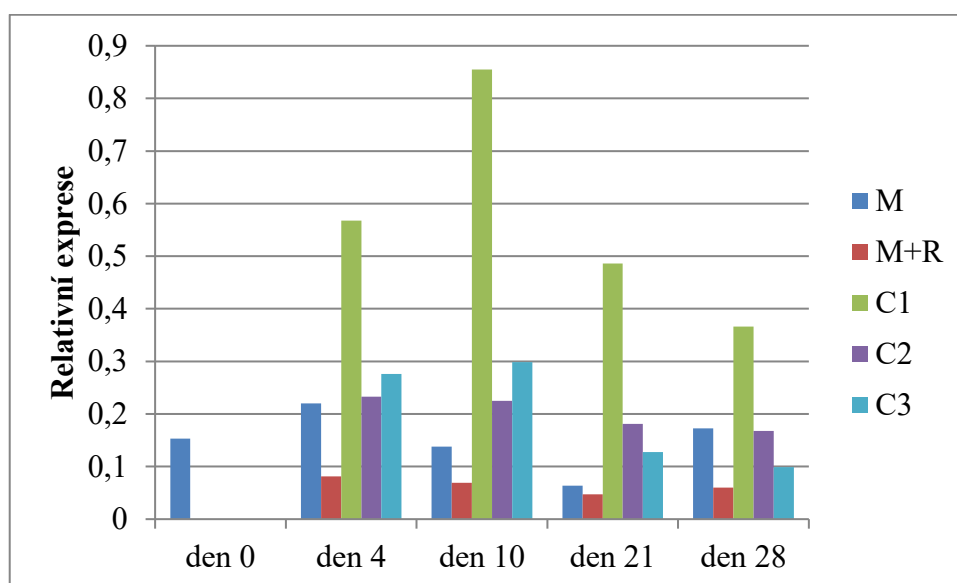
LIPE kóduje hormon-senzitivní lipázu zodpovědnou za štěpení triglyceridů na mastné kyseliny [Carmen, 2006].



Obrázek 23 - Souvislost signální dráhy insulinu s adipogenezí a metabolismem lipidů, upraveno dle [Pešta et al., 2018]

4.2 Výsledky a diskuze vztahující se k cíli 2

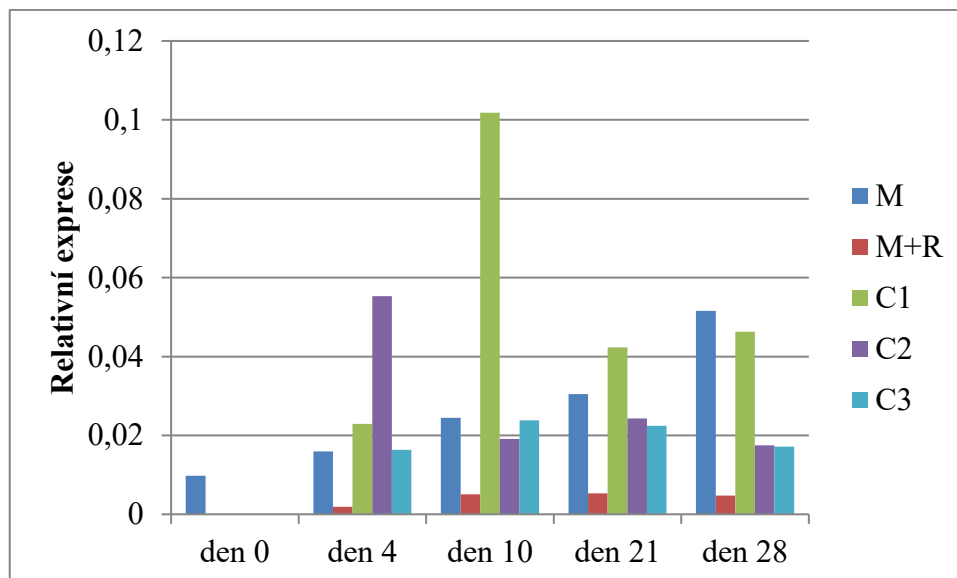
V průběhu 28denní diferenciaci došlo ke statisticky významnému snížení exprese genu OCT4 v médiu obohaceném lipidy oproti samotného standardního diferenciacního médiu (obrázek 24). To znamená, že přítomnost lipidů v médiu způsobila zkrácení doby, kdy jsou buňky v multipotentním stavu a urychlila jejich diferenciaci. Naproti tomu kultivace v médiu obohaceném o DDE významně zvýšila expresi OCT4. DDE obsažené v kultivačním médiu tedy způsobilo změnu v programu diferenciaci, a to tak, že došlo k prodloužení doby kmenovosti buněk.



Obrázek 24 - Změny exprese genu OCT4 v průběhu diferenciaci pod vlivem DDE

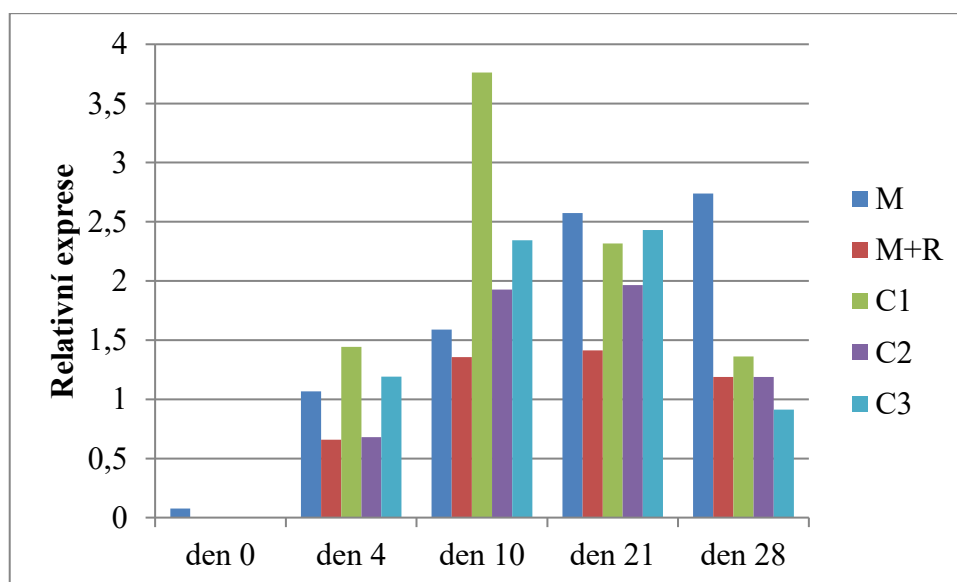
Legenda: M = diferenciacní médium; M+R = diferenciacní médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciacní médium s DDE o c = 0,1 μ M; C2 = diferenciacní médium s DDE o c = 1 μ M; C3 = diferenciacní médium s DDE o c = 10 μ M.

V průběhu diferenciaci bylo v čistém diferenciacním médiu pozorováno zvýšení exprese PPARGC1B a PPARG (obrázek 25 a 26). Oproti němu došlo ke statisticky významnému poklesu exprese těchto genů v diferenciacním médiu obohaceném lipidy. V přítomnosti DDE o koncentraci 0,1 μ M došlo do 10. dne průběhu diferenciaci k významnému zvýšení exprese PPARGC1B i PPARG.



Obrázek 25 - Změny exprese genu PPARGC1B v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE

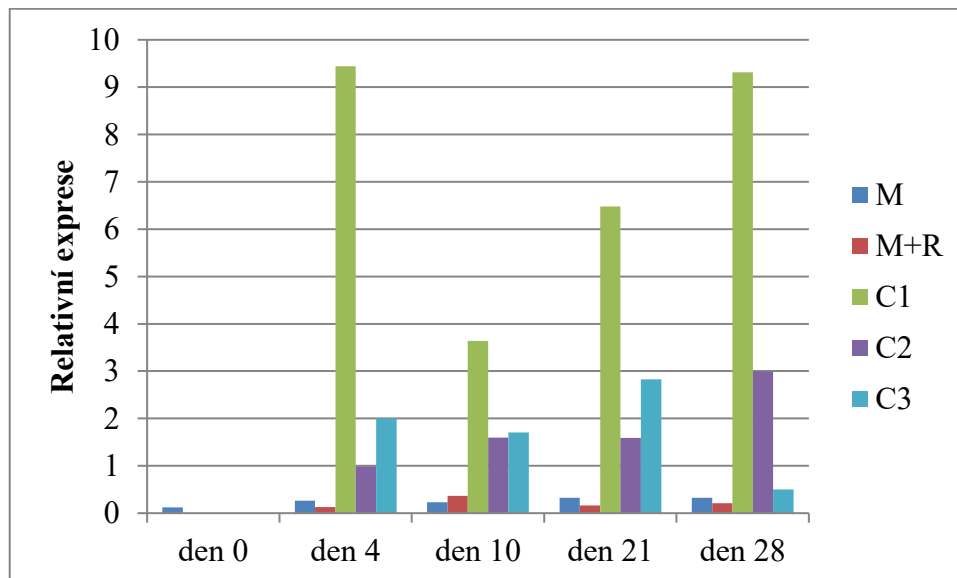
Legenda: M = diferenciacní médium; M+R = diferenciacní médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciacní médium s DDE o c = 0,1 μM ; C2 = diferenciacní médium s DDE o c = 1 μM ; C3 = diferenciacní médium s DDE o c = 10 μM .



Obrázek 26 - Změny exprese genu PPARG v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE

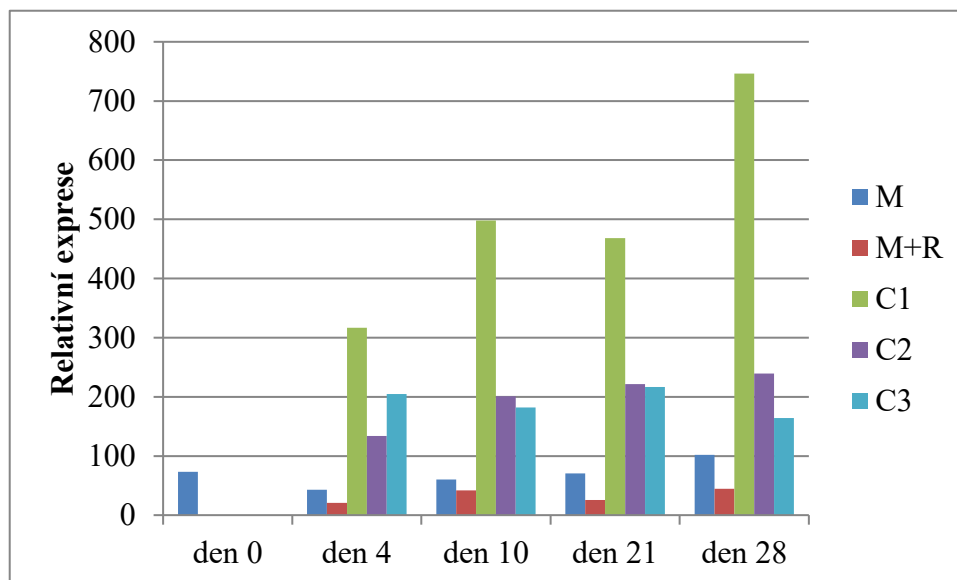
Legenda: M = diferenciacní médium; M+R = diferenciacní médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciacní médium s DDE o c = 0,1 μM ; C2 = diferenciacní médium s DDE o c = 1 μM ; C3 = diferenciacní médium s DDE o c = 10 μM .

V médiu obohaceném lipidy bylo ve srovnání se standardním diferenciačním médiem zjištěno významné snížení exprese AKT2. Kultivace v médiu s DDE způsobila výrazné zvýšení exprese INSR a AKT2, hlavně při nižší koncentraci polutantu (obrázek 27 a 28).



Obrázek 27 - Změny exprese genu INSR v průběhu diferenciacie pod vlivem DDE

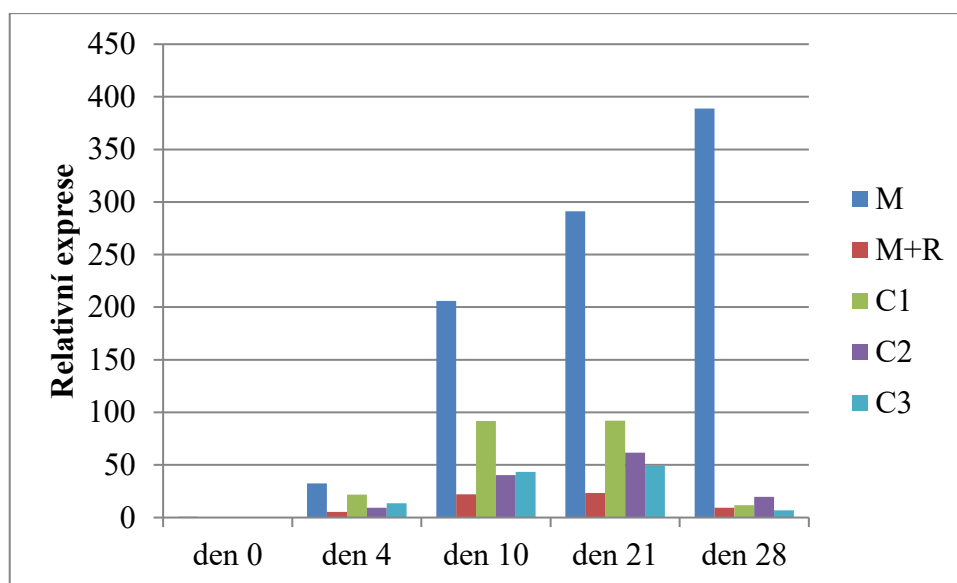
Legenda: M = diferenciační médium; M+R = diferenciační médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciační médium s DDE o c = 0,1 μ M; C2 = diferenciační médium s DDE o c = 1 μ M; C3 = diferenciační médium s DDE o c = 10 μ M.



Obrázek 28 - Změny exprese genu AKT2 v průběhu diferenciacie pod vlivem DDE

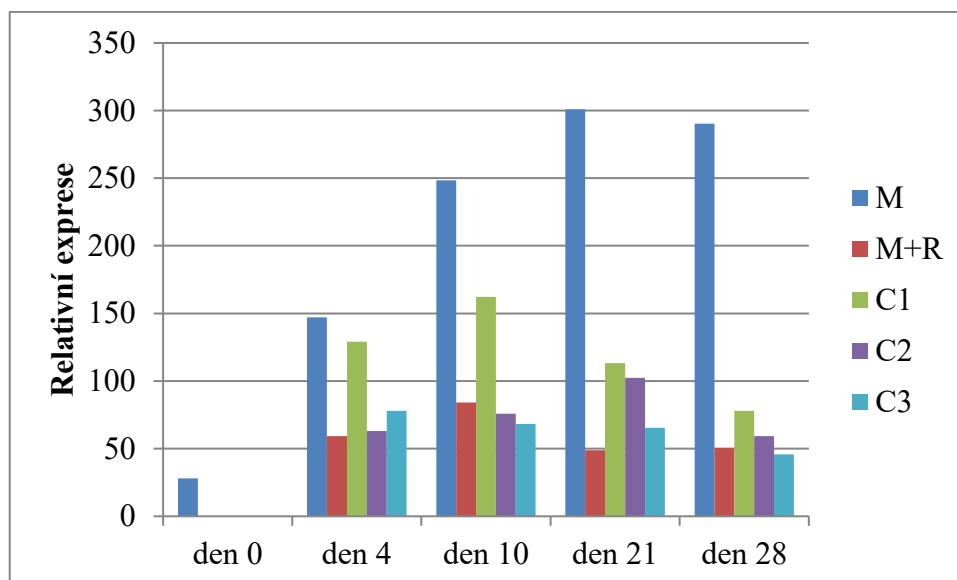
Legenda: M = diferenciační médium; M+R = diferenciační médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciační médium s DDE o c = 0,1 μ M; C2 = diferenciační médium s DDE o c = 1 μ M; C3 = diferenciační médium s DDE o c = 10 μ M.

V diferenciačním médiu obohaceném lipidy bylo ve srovnání se standardním diferenciačním médiem pozorováno statisticky významné snížení exprese ACLY, FASN a LIPE (obrázek 29, 30 a 31). Kultivace v médiu obsahující DDE zvýšila expresi FASN a LIPE. U ACLY byl tento účinek významný pouze v koncentraci 0,1 μM . Je třeba rozlišovat vliv DDE na metabolismus v přítomnosti přidaných lipidů a bez nich. Zatímco exprese ACLY a LIPE se v přítomnosti lipidů snižuje, DDE tento účinek mírně, ale významně, zmenšuje. Exprese FASN je ovlivněna převážně DDE, a to výrazněji v nižších koncentracích.



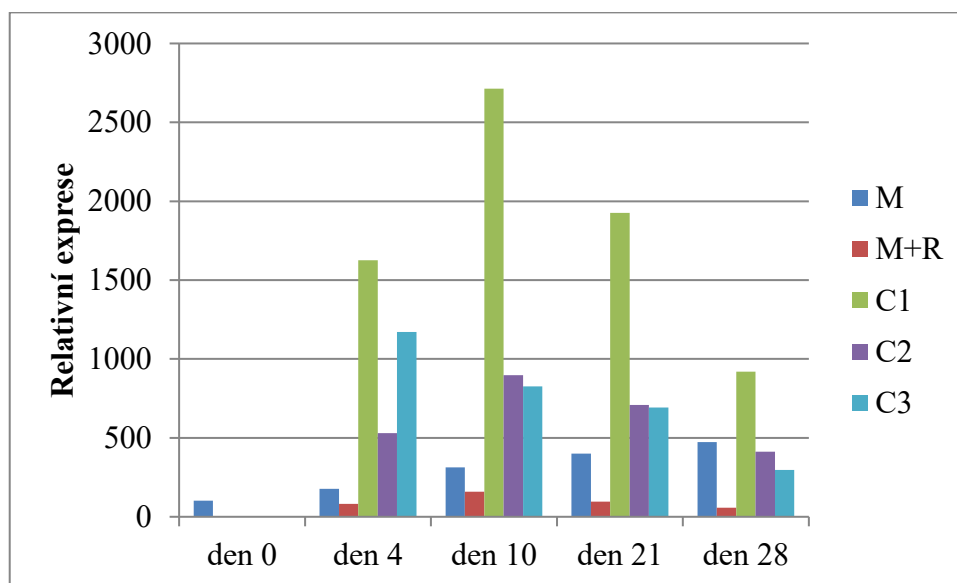
Obrázek 29 - Změny exprese genu LIPE v průběhu diferenciaci pod vlivem DDE

Legenda: M = diferenciační médium; M+R = diferenciační médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciační médium s DDE o c = 0,1 μM ; C2 = diferenciační médium s DDE o c = 1 μM ; C3 = diferenciační médium s DDE o c = 10 μM .



Obrázek 30 - Změny exprese genu ACLY v průběhu diferenciaci pod vlivem DDE

Legenda: M = diferenciacní médium; M+R = diferenciacní médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciacní médium s DDE o c = 0,1 μ M; C2 = diferenciacní médium s DDE o c = 1 μ M; C3 = diferenciacní médium s DDE o c = 10 μ M.



Obrázek 31 - Změny exprese genu FASN v průběhu diferenciaci pod vlivem DDE

Legenda: M = diferenciacní médium; M+R = diferenciacní médium s rozpouštědlem; C1 = diferenciacní médium s DDE o c = 0,1 μ M; C2 = diferenciacní médium s DDE o c = 1 μ M; C3 = diferenciacní médium s DDE o c = 10 μ M.

Diskuze

DDE je metabolitem známého insekticidu DDT. Za objevení insekticidních účinků DDT získal v roce 1948 Paul Müller Nobelovu cenu. Původně se používalo jako insekticid k potlačení malárie, ale jeho použití velmi rychle rostlo. V roce 1972 jeho použití Spojené státy americké zakázaly z důvodu jeho nepříznivých environmentálních účinků. V roce 2001 se podepsáním Stockholmské konvence k tomuto rozhodnutí přidaly i další státy, ale přesto je DDT stále doporučováno WHO pro postřik vnitřních prostor jako prevence proti malárii. Proto je také nadále vyráběno [Elmore a La Merrill, 2019].

V současných přehledových článcích a metaanalýzách jsou DDT a DDE klasifikovány jako obezogeny a jsou asociovány s dalšími onemocněními spojenými s obezitou, a to DM2T, Alzheimerovou chorobou a rakovinou. Mechanismus působení DDT nebo DDE, který k těmto onemocněním vede, není zatím vyřešený. Jednou hypotézou je, že se jedná o látku poškozující mitochondriální funkce [Elmore a La Merrill, 2019].

DDE je známé jako bioakumulativní polutant s afinitou k tukové tkáni. Dílčím cílem této práce bylo sledovat vliv DDE na proces diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk v adipocyty a rovněž jeho vliv na geny insulinové signální dráhy a lipidového metabolismu.

Kultivace v médiu obsahujícím DDE významně zvýšila expresi OCT4. DDE obsažené v kultivačním médiu tedy způsobilo změnu v programu diferenciaci, a to tak, že udržovalo buňky déle v multipotentním stavu. V souladu s tímto zjištěním je práce dalších autorů, která ukazuje proliferativní efekt DDE na preadipocyty a další buňky [Chapados et al., 2012; Aubé et al., 2011].

PPARGC1B je členem skupiny PGC-1, multifunkčních transkripčních koregulátorů, kteří působí jako “molekulární přepínače” v mnoha metabolických pochodech. PPARGC1B reguluje mitochondriální oxidativní metabolismus. Uldry et al. [2006] pozorovali, že exprese PGC1B je vyvolána během diferenciaci bílých a hnědých adipocytů. Výsledek této práce ukazuje to samé, v průběhu diferenciaci v diferenciacním médiu došlo ke zvýšení exprese PPARGC1B, pod vlivem DDE ještě k výraznějšímu.

Je třeba zmínit, že buňky kultivované pod vlivem DDE vypadaly vizuálně jako lépe prosperující a diferencující. Toto pozorování je v souladu s výsledky práce Mangum et al. [2015], ačkoliv ta byla prováděna na myší buněčné linii 3T3-L1.

Bylo zjištěno, že hyperinsulinemie v souvislosti s obezitou ovlivňuje zánět tukové tkáně, což podporuje podmínky, které potlačují nejen lipogenezi adipocytů *de novo* stimulovanou insulinem, ale i citlivost na insulin [Pedersen et al., 2015].

Vzhledem k tomu, že v médiu byla během kultivace vyšší koncentrace insulínu než je fyziologická norma, byly buňky pod stálou stimulací insulínu, takže by neměly reagovat zvýšením exprese INSR. Přesto byl naměřen výrazný nárůst exprese INSR a AKT2 v přítomnosti DDE, zejména v médiu s nejnižší koncentrací polutantu. Zatímco při kultivaci v čistém diferenciačním médiu a v médiu obohaceném lipidy je exprese INSR relativně nízká, expozice DDE způsobila značný nárůst. Zvýšení exprese insulinového receptoru tedy musí souviset s účinky DDE.

Kultivace v médiu obohaceném lipidy snižuje hodnoty transkripčního faktoru AKT2, který reguluje expresi FASN. DDE však radikálně mění tento účinek, protože jeho přítomnost způsobuje nadměrnou expresi FASN navzdory skutečnosti, že syntéza mastných kyselin není v médiu bohatém na lipidy nutná. V tomto smyslu DDE stimuluje syntézu mastných kyselin.

Ačkoliv nebylo zaregistrováno významné zvýšení exprese AKT2, bylo naměřeno zvýšení exprese genů *ACLY* a *FASN* podílejících se na lipogenezi, což je považováno za efekt insulínu. To naznačuje ještě jiný mechanismus regulace těchto genů. Jedním z nich by mohla být inhibice transkripční aktivity glukokortikoidního jaderného receptoru polutantem [Wilson et al., 2016].

Podobně jako u genů podílejících se na lipogenezi, způsobilo DDE přidané do diferenciačního média zvýšení exprese genu *LIPE* spojeného s metabolismem lipidů. Přítomnost lipidů v diferenciačním médiu snížilo expresi *LIPE* ve srovnání s expresí v buňkách kultivovaných v čistém médiu. DDE tento efekt zmenšuje, v přítomnosti lipidů syntézu lipidů stimuluje.

PPARG je lipidy aktivovaný transkripční faktor regulující geny zapojené v diferenciaci adipocytů a metabolismu lipidů včetně *FASN* [Watanabe et al., 2003]. Pod vlivem DDE se exprese *PPARG* zvyšuje, což zřejmě rovněž přispívá k pozorovanému zvýšení exprese *FASN*. V době plné diferenciace do adipocytů bylo pozorováno snížení exprese *PPARG* v buněčných kulturách vystavených lipidům. Pod vlivem DDE navíc došlo v den 10 a 21 ke zvýšení exprese tohoto genu. Jedním z účinků DDE je zřejmě urychlení diferenciace z pohledu rychlejšího dosažení adipocytárních znaků.

Na základě hodnocení exprese genů podílejících se na syntéze lipidů a její regulaci se zdá, že vliv DDE na diferencující se adipocyty je podobný účinku samotného insulínu, mimo to, že zvyšuje syntézu lipidů. Toto zjištění je v souladu s epidemiologickou studií Tang-Péronarda et al. [2015], kde byla vysoká expozice DDE před narozením dána do souvislosti s vysokými hladinami insulínu u pětiletých dívek. V kontextu tohoto je zajímavý rovněž výsledek Howella et al. [2014], kteří zjistili, že expozice myši DDE způsobila hyperglykémii, která nebyla způsobena insulinovou resistencí. Ti samí autoři uvádějí, že chronická expozice DDE navzdory počáteční hyperglykémii vede k

normalizaci glykémie. Zdá se, že tato normalizace hladin glukózy je výsledkem zvýšené citlivosti na insulin.

Pod vlivem DDE vzrůstající exprese těchto genů vede k syntéze mastných kyselin. La Merrill et al. [2014] popisuje, že vystavení myši pesticidu DDE vedlo ke zvýšení tělesného tuku u jejich potomků.

Kim et al. [2016] publikovali výsledky studie efektu DDT a DDE na diferenciaci adipocytů a metabolismus lipidů. Jako adipocytární model použili myši linii 3T3-L1 a DDE rozpouštěli v dimethylsulfoxidu. Analyzovali expresi PPARG, FASN, ACLY a LIPE a rovněž pozorovali vyšší expresi těchto genů v buňkách vystavených DDE.

Pestana et al. [2017] popisovali efekty expozice DDE na myši Wistar. Shrnuli, že vystavení DDE přispívá k rozvoji metabolického syndromu a obezité.

5 ZÁVĚRY

5.1 Závěry vztahující se k cíli 1

V průběhu diferenciaci byly pozorovány morfologické změny mesenchymálních buněk, kdy se buňky typického protáhlého vřetenovitého tvaru měnily na adipocyty vyplněné tukovými kapénkami. Tyto změny byly fotodokumentovány ve stanovené dny – 0, 4, 10 a 21. Po 10. dni diferenciaci došlo k největšímu nárůstu velikosti tukových kapének uvnitř dozrávajících adipocytů a 21. den pak již tukové kapénky vyplňovaly značnou část buňky. Toto bylo potvrzeno i barvením Oil Red O, pomocí něhož byly tukové kapénky vizualizovány, ve spojení s kvantifikací zachyceného barviva jeho spektrofotometrickým měřením.

Diferenciaci mesenchymálních buněk v adipocyty byla potvrzena fluorescenční imunocytochemií, kde byl jako marker použit specifický protein fatty acid binding protein 4 (FABP4). Tento cytoplazmatický protein je exprimovaný převážně v adipocytech a jeho funkcí je vyčítávání mastných kyselin s dlouhým řetězcem a jejich transport a metabolismus.

Pomocí metody PrestoBlue™ Cell Viability Reagent byla stanovována viabilita buněk, kdy vyšší hodnota fluorescence koreluje s vyšší celkovou metabolickou aktivitou buněk. V průběhu diferenciaci nebyly pozorovány signifikantní změny v buněčné viabilitě.

Důležitou roli hrají ve zrajícím adipocytu mitochondrie. Postupně dochází ke zvyšování jejich počtu a ke změně jejich distribuce uvnitř buňky. To je v souladu s navyšováním metabolismu buňky.

K monitoraci funkčního stavu mitochondrií bylo použito stanovení mitochondriálního membránového potenciálu spektrofotometricky pomocí barviva JC-1 a průtokovou cytometrií. V průběhu diferenciaci byl v obou případech pozorován pokles poměru červené/zelené fluorescence. To je nejspíše způsobeno zvýšenou expresí rozpráhučících proteinů skupiny UCP způsobenou nárůstem mitochondriální biogeneze v průběhu diferenciaci buněk, což vede ke stavu depolarizace mitochondriální membrány.

Genovou expresí vybraných genů RT-PCR byla rovněž potvrzena diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk v adipocyty. Expresí genu OCT4 udržujícího buňky v multipotentním stavu v průběhu diferenciaci klesá, jak buňky opouštějí multipotentní stav a ztrácejí schopnost proliferace. Naproti tomu geny řídící diferenciaci v adipocyty (PPARG a PPARGC1B) a geny metabolismu lipidů a insulinové signální dráhy (INSR, AKT2, ACLY, LIPE, FASN) v průběhu diferenciaci rostou, tak jak se kmenová buňka postupně mění na adipocyt vykonávající konkrétní metabolické funkce.

5.2 Závěry vztahující se k cíli 2

Přidání lipidů do diferenciačního média simulující nutričně toxické prostředí statisticky významně snižuje u diferencujících se adipocytů z hADMSC expresi genů regulujících adipogenezi, především OCT4, PPARG a PPARGC1B.

Expozice DDE zvyšuje statisticky významně expresi INSR, AKT2, včetně LIPE, ACLY a FASN oproti diferenciačnímu médiu s přidanými lipidy, to ukazuje na narušené regulační mechanismy v buňkách. Lipidový metabolismus se zvyšuje, je syntetizováno více triglyceridů, může se tak snáze rozvíjet obezita a metabolická onemocnění, která souvisejí s insulinovou signální dráhou, kdy se účinek DDE podobá účinku insulinu.

Expozice DDE tedy mění diferenciaci adipocytů a zvyšuje metabolismus lipidů v přítomnosti nutričně toxického prostředí zátěže lipidy. Je tak narušeno uskladňování lipidů uvnitř tukových kapének, snížena adaptační funkce zrajícího adipocytu na vnější zátěž tukem a zdůrazněna insulinová signální dráha. Pro výsledný zdravotní efekt je pak během diferenciaci adipocytu rozhodující koncentrace polutantů a jejich vzájemné namixování. Tyto změny na molekulární úrovni adipocytu pak mohou měnit funkční zdatnost tukové tkáně a přispívat nejen k obezitě, ale zejména k jejím metabolickým komplikacím ve formě insulinové rezistence.

Tato práce tak potvrzuje názory, že perzistentní organické polutanty nejsou v tukové tkáni pouze pasivně uloženy, ale že aktivně vstupují do metabolických funkcí a narušují je.

5.3 Závěry pro praxi a výhled do budoucna

Tuková tkáň má kromě funkce skladování energie i další funkce, a to funkci endokrinní a imunitní. V současné době by její další výzkum na molekulární úrovni mohl přinést další poznatky, které přispějí k léčbě obezity a jejích mnohých komplikací. Z toho vyplývá rovněž potřebný výzkum tukové kapénky, neboť pochopení jejích základních biologických vlastností, jejích vztahů k ostatním organelám, a mechanismů, které v ní probíhají, by mohl osvětlit řadu patologických stavů a poskytnout nové molekulární cíle pro terapii.

Rovněž lepší porozumění stimulace aktivity hnědých a béžových adipocytů během tělesného cvičení by mohlo také pomoci s bojem proti obezitě, a zlepšit tak metabolické zdraví.

Obezita je v současné době celosvětovým zdravotním problémem, kterému lze preventivně předcházet. Lepším pochopením všech fyziologickým dějům vedoucím k tomuto onemocnění by tak mohlo zamezit nesčetoným ekonomickým ztrátám, které jsou spojené s léčbou a pracovní neschopností. Současné metody léčby obezity zahrnují dietoterapii, programy fyzické aktivity, psychologickou podporu, farmakoterapii a chirurgickou léčbu (bariatrické operace). Nutná je velká motivace pacienta změnit celý svůj životní styl.

Funkce tukové tkáně může být narušena i chemickými látkami ze životního prostředí. Tzv. endokrinní disruptory mohou vznik obezity a jejích komplikací podporovat. Výzkum patologických efektů těchto látek by mohl rovněž pomoci v prevenci těchto onemocnění. K tomu se ovšem pojí ochrana životního prostředí, snaha tyto látky v běžném životě používat co nejméně.

Seznam použité literatury

ABDEL-MAGID, A.F. Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitors as Potential Treatment for Cancer, Obesity, and Liver Related Disorders. *ACS Med Chem Lett*[online]. 2015 Jul 15;6(8):838-9. Dostupné z doi: 10.1021/acsmchemlett.5b00275.

ABELLA, V. et al. Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases. *Journal of Immunology Research* [online]. 2014, 343746. ISSN 2314-7156. Dostupné z: doi:10.1155/2014/343746.

ABRAMCZYK, H., SURMACKI, J., KOPEĆ, M., OLEJNIK, A.K., LUBECKA-PIETRUSZEWSKA, K. a K. FABIANOWSKA-MAJEWSKA. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst* [online]. 2015, 140(7), 2224–2235. ISSN 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/c4an01875c.

ACHOUR, A. et al. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from northern Tunisia: Current extent of contamination and contributions of socio-demographic characteristics and dietary habits. *Environmental Research* [online]. 2017, 156, 635–643. ISSN 1096-0953. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2017.04.021.

ARNIKA. *Dichlordifenyiltrichloretan (DDT)* [online]. REPEŠ, Kamil. ©2014 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: <http://arnika.org/dichlordifenyiltrichloretan-ddt>.

AUBÉ, M., LAROCHELLE, Ch. a P. AYOTTE. Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environ Res* [online]. 2011 Apr;111(3):337-47. Dostupné z doi: 10.1016/j.envres.2011.01.010.

BABA, T. et al. Association of prenatal exposure to PCDD/Fs and PCBs with maternal and infant thyroid hormones: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *The Science of the Total Environment* [online]. 2018, 615, 1239–1246. ISSN 1879-1026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.038.

BEILSTEIN, F., CARRIÈRE, V., LETURQUE, A. a S. DEMIGNOT. Characteristics and functions of lipid droplets and associated proteins in enterocytes. *Exp Cell Res*. [online]. 2016, Jan 15;340(2):172-9. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.09.018.

BENJAMIN, S., MASAI, E., KAMIMURA, N., TAKAHASHI, K., ANDERSON, R.C. a P.A. FAISAL. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2017, 340, 360–383. ISSN 1873-3336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2017.06.036.

BERKEN, G.H., WEINSTEIN, D.O. a W.C. STERN. Weight gain. A side-effect of tricyclic antidepressants. *Journal of Affective Disorders*. 1984, 7(2), 133–138. ISSN 0165-0327. PMID: 6238068.

BEST, D. a S. BHATTACHARYA. Obesity and fertility. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* [online]. 2015, 24(1), 5–10. ISSN 1868-1891. Dostupné z: doi:10.1515/hmbci-2015-0023.

BICKEL, P.E., TANSEY, J.T. a M.A. WELTE. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2009, 1791(6), 419–440. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbaliip.2009.04.002.

BIZZARI, S. et al. Novel SPG20 mutation in an extended family with Troyer syndrome. *Metabolic Brain Disease* [online]. 2017, 1–5. ISSN 0885-7490, 1573-7365. Dostupné z: doi:10.1007/s11011-017-0104-3.

BOSCHI, F., RIZZATTI, V., ZAMBONI, M. a A. SBARBATI. Models of lipid droplets growth and fission in adipocyte cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2015, 336(2), 253–262. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.06.001.

BOSMA, M. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. *Experimental Cell Research* [online]. 2016, Jan 15;340(2):180-6. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.023.

BOSTRÖM, P. et al. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology* [online]. 2007, 9(11), 1286–1293. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1648.

BOZZA, P.T. a J.P.B. VIOLA. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* [online]. 2010, 82(4–6), 243–250. ISSN 1532-2823. Dostupné z: doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005.

CARMEN, G.Y. a S.M. VÍCTOR. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* [online]. 2006 Apr;18(4):401-8. PMID: 16182514.

CARR, R.M. a R.S. Rexford. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Experimental Cell Research* [online]. 2016, Jan 15;340(2):187-92. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.021.

CASTRANOVA, V., RABOVSKY, J., TUCKER J. H. a P.R. MILES. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1988, 93(3), 472–483. ISSN 0041-008X.

CIGNARELLI, A., GENCHI, V.A., PERRINI, S., NATALICCHIO, A., LAVIOLA, L. a F. GIORGINO. Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int. J. Mol. Sci.* [online]. 2019, Feb 11;20(3). pii: E759. Dostupné z doi: 10.3390/ijms20030759.

CINTI, S. Adipose Organ Development and Remodeling. *Comprehensive Physiology* [online]. 2018, 8(4), 1357–1431. ISSN 2040-4603. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c170042.

CORRALES, P., IZQUIERDO-LAHUERTA, A. a G. MEDINA-GÓMEZ. Maintenance of Kidney Metabolic Homeostasis by PPAR Gamma. *Int J Mol Sci.* [online]. 2018 Jul 16;19(7). pii: E2063. Dostupné z doi: 10.3390/ijms19072063. PMID: 30012954.

CUOMO, D. et al. Carcinogenic risk and Bisphenol A exposure: A focus on molecular aspects in endoderm derived glands. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2017, 457, 20–34. ISSN 1872-8057. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2017.01.027.

CZABANY, T. et al. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, 283(25), 17065–17074. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M800401200.

ČEDÍKOVÁ, M. et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International* [online]. 2016. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2016/6067349. PMID: 27073398.

Česká onkologická společnost ČLS JEP. *Výskyt zhoubných nádorů prsu v ČR* [online]. © 2018 ČOS ČLS JEP | [ISSN 2570-8791](https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/vyskyt-zhoubnych-nadoru-prsu-v-cr/). Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/vyskyt-zhoubnych-nadoru-prsu-v-cr/>

DARBRE, P.D. Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports* [online]. 2017, 6(1), 18–27. ISSN 2162-4968. Dostupné z: doi:10.1007/s13679-017-0240-4.

DE FRANCESCO, F., RICCI, G., D'ANDREA, F., NICOLETTI, G.F. a G.A. FERRARO. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* [online]. 2015, 21(6), 572–584. ISSN 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.TEB.2014.0608.

DE PAUW, A., TEJERINA, S., RAES, M., KEIJER, J. a T. ARNOULD. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *The American Journal of Pathology* [online]. 2009, 175(3), 927–939. ISSN 1525-2191. Dostupné z: doi:10.2353/ajpath.2009.081155.

DIRINCK, E.L., DIRTU, A.C., GOVINDAN, M., COVACI, A., VAN GAAL, L.F. a P.G. JORENS. Exposure to persistent organic pollutants: relationship with abnormal glucose

metabolism and visceral adiposity. *Diabetes Care* [online]. 2014, 37(7), 1951–1958. ISSN 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/dc13-2329.

DREHMER, D.L. et al. Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. *Stem Cell Research* [online]. 2016, Sep;17(2):413-421. Dostupné z doi: 10.1016/j.scr.2016.09.001.

DVOŘÁKOVÁ, J. et al. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vznik metabolického syndromu. *Chemické listy*. 2015, 109, 418-423.

DVOŘÁKOVÁ, J., ČEDÍKOVÁ, M., MALEČKOVÁ, A., KULDA, V., TONAR, Z. a D. MÜLLEROVÁ. Vznik a vývoj tukové kapénky a její role ve zdraví a nemoci. *Časopis lékařů českých*. 2018, 157:254-262.

ELMORE, S.E. a M.A. LA MERRILL. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Front Endocrinol (Lausanne)* [online]. 2019 Mar 12;10:122. doi: 10.3389/fendo.2019.00122. PMID: 30915030.

FARESE, R.V. a WALTHER, T.C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* [online]. 2009, 139(5), 855–860. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.11.005.

FAVA, M. Weight gain and antidepressants. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2000, 61 Suppl 11, 37–41. ISSN 0160-6689. PMID: 10926053.

FERDINAND, K.C. et al. Cardiorenal metabolic syndrome and cardiometabolic risks in minority populations. *Cardiorenal Medicine* [online]. 2014, 4(1), 1–11. ISSN 1664-3828. Dostupné z: doi:10.1159/000357236.

FRIED, M. [New directions in bariatric and metabolic surgery]. *Cas Lek Cesk*. 2017, 156(6), 314–318. ISSN 0008-7335. PMID: 29212336.

FUJIMOTO, T., OHSAKI, Y., CHENG, J., SUZUKI, M. a Y. SHINOHARA. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 2008, 130(2), 263–279. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-008-0449-0.

FUJIMOTO, T. a R.G. PARTON. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, 3(3). ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a004838.

FURUE, M., FUYUNO, Y., MITOMA, Ch., UCHI, H. a G. TSUJI. Therapeutic Agents with AHR Inhibiting and NRF2 Activating Activity for Managing Chloracne. *Antioxidants*

(Basel, Switzerland) [online]. 2018, 7(7). ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox7070090.

GAN, L., LIU, Z., CAO, W., ZHANG, Z. a C. SUN. FABP4 reversed the regulation of leptin on mitochondrial fatty acid oxidation in mice adipocytes. *Sci Rep.* [online]. 2015 Aug 27;5:13588. Dostupné z doi: 10.1038/srep13588.

GARCIA, E.J., VEVEA, J.D. a L.A. PON. Lipid droplet autophagy during energy mobilization, lipid homeostasis and protein quality control. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2018, Mar 1;23, 1552–1563. ISSN 1093-4715. PMID: 29293450.

GÉRARD, C. a K.A. BROWN. Obesity and breast cancer - Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2018, 466, 15–30. ISSN 1872-8057. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2017.09.014.

GORAN, M.I., DUMKE, K., BOURET, S.G., KAYSER, B., WALKER, R.W. a B. BLUMBERG. The obesogenic effect of high fructose exposure during early development. *Nature Reviews. Endocrinology* [online]. 2013, 9(8), 494–500. ISSN 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2013.108.

GROSS, D.A., ZHAN, Ch. a D.L. SILVER. Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, 108(49), 19581–19586. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1110817108.

GRÜN, F. a B. BLUMBERG. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* [online]. 2006, 147(6 Suppl), S50-55. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2005-1129.

GUGLIELMI, V. a P. SBRACCIA. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eating and weight disorders: EWD* [online]. 2018, 23(1), 3–14. ISSN 1590-1262. Dostupné z: doi:10.1007/s40519-017-0467-9.

HAINER, V. *Základy klinické obezitologie. 2.*, přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2011. 448 s. ISBN 978-80-247-3252-7.

HALUZÍK, M., TRACHTA P., a D. HALUZÍKOVÁ. [Adipose tissue hormones]. *Vnitř Lek.* 2010 Oct; 56(10), 1028–1034. ISSN 0042-773X. PMID: 21105447.

HAN, X. et al. Plin4-Dependent Lipid Droplets Hamper Neuronal Mitophagy in the MPTP/p-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2018, 12, 397. ISSN 1662-4548. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2018.00397.

HARRAD, S. *Persistent Organic Pollutants*. 1. vydání. Wiltshire: Blackwell Publishing Ltd, 2010. 288 s. ISBN: 978-1-405-16930-1.

HASHEMI, H.F. a J.M. GOODMAN. The life cycle of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2015, 33, 119–124. ISSN 1879-0410. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2015.02.002.

HATCH, E.E. et al. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of obesity in adult women. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* [online]. 2015, 6(3), 201–207. ISSN 2040-1752. Dostupné z: doi:10.1017/S2040174415000033.

HEILBRONN, L.K., GAN, S.K., TURNER, N., CAMPBELL L.V. a D.J. CHISHOLM. Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 2007, 92(4), 1467–1473. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2006-2210.

HEINDEL, J.J., NEWBOLD, R. a T.T. SCHUG. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews. Endocrinology* [online]. 2015, 11(11), 653–661. ISSN 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2015.163.

HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L.A. et al. Persistent organic pollutants and risk of diabetes and obesity on healthy adults: Results from a cross-sectional study in Spain. *The Science of the Total Environment* [online]. 2017, 607–608, 1096–1102. ISSN 1879-1026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.075.

HLÚBIK, P. *Epidemiologie a etiopatogeneze obezity* [online]. Postgraduální medicína. 5.4.2005. Copyright 2018 Mladá fronta a. s. [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-a-etiotogeneze-obezity-165979>

HOEPNER, L.A. Bisphenol a: A narrative review of prenatal exposure effects on adipogenesis and childhood obesity via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Environ Res.* 2019 Jun;173:54-68. Dostupné z doi: 10.1016/j.envres.2019.03.012.

HOFMANN, A.D., BEYER, M., KRAUSE-BUCHHOLZ, U., WOBUS, M., BORNHÄUSER, M. a G. RÖDEL. OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS One*. 2012;7(4):e35160. Dostupné z doi: 10.1371/journal.pone.0035160.

HOLOUBEK, I., KOČAN, A., HOLOUBKOVÁ, I. a J. KOHOUTEK. *Persistentní organické polutanty*. In TOCOEN REPORT No. 199 [online]. červen 2001 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: http://www.recetox.muni.cz/res/file/narodni_centrum/reg-centrum/unipo/Anex_11.pdf.

HØYER, B.B. et al. Impact of Di-2-Ethylhexyl Phthalate Metabolites on Male Reproductive Function: a Systematic Review of Human Evidence. *Current Environmental Health Reports* [online]. 2018, 5(1), 20–33. ISSN 2196-5412. Dostupné z: doi:10.1007/s40572-018-0174-3.

HOWELL, G.E., MEEK, E., KILIC, J., MOHNS, M., MULLIGAN, Ch. a J.E. CHAMBERS. Exposure to p,p'-dichlorodipenyldichloroethylene (DDE) induces fasting hyperglycemia without insulin resistance in male C57BL/6H mice. *Toxicology*. 2014 Jun 5;320:6-14. Dostupné z doi: 10.1016/j.tox.2014.02.004.

HU, P. et al. Methylparaben and butylparaben alter multipotent mesenchymal stem cell fates towards adipocyte lineage. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2017, 329, 48–57. ISSN 1096-0333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2017.05.019.

CHAMBERS, T.J.G. a R.A. RICHARD. The impact of obesity on male fertility. *Hormones (Athens, Greece)* [online]. 2015, 14(4), 563–568. ISSN 2520-8721. Dostupné z: doi:10.14310/horm.2002.1621.

CHAPADOS, N.A. et al. Increased proliferative effect of organochlorine compounds on human preadipocytes. *Mol Cell Biochem* [online]. 2012 Jun;365(1-2):275-8. Dostupné z doi: 10.1007/s11010-012-1268-0.

CHEN, X. a J.M. GOODMAN. The collaborative work of droplet assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2017, 1862(10 Pt B), 1205–1211. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbailip.2017.07.003.

CHYPRE, M., ZAIDI, N. a K. SMANS. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun* [online]. 2012 May 25;422(1):1-4. Dostupné z doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.144.

JIMENEZ TORRES, M. et al. Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. *The Science of the Total Environment* [online]. 2006, 372(1), 32–38. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.009.

KARAHUSEYINOGLU, S., KOCAEFE, C., BALCI, D., ERDEMLI, E. a A. CAN. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-

derived stem cells. *Stem Cells* [online]. 2008 Mar;26(3):682-91. Dostupné z doi: 10.1634/stemcells.2007-0738. PMID: 18192234.

KIM, J. et al. 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture. *Pestic Biochem Physiol.* [online]. 2016 Jul;131:40-5. Dostupné z doi: 10.1016/j.pestbp.2016.01.005.

KIMMEL, A.R., BRASAEMLE, D.L., McANDREWS-HILL, M., SZTALRYD, C. a C. LONDOS. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J. Lipid Res.* [online]. 2010 Mar;51(3):468-71. Dostupné z doi: 10.1194/jlr.R000034. PMID: 19638644.

KRAHMER, N., FARESE, R.V. a T.C. WALTHER. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO molecular medicine* [online]. 2013, 5(7), 973–983. ISSN 1757-4684. Dostupné z: doi:10.1002/emmm.201100671.

LA MERRILL, M. et al. Perinatal exposure of mice to the pesticide DDT impairs energy expenditure and metabolism in adult female offspring. *PLoS One* [online]. 2014 Jul 30;9(7):e103337. Dostupné z doi: 10.1371/journal.pone.0103337.

LIU, Ch. a J.D. LIN. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* [online]. 2011 Apr;43(4):248-57. Dostupné z doi: 10.1093/abbs/gmr007.

MALARVANNAN, G. et al. Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environment international* [online]. 2013, 55, 33–42. ISSN 1873-6750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2013.02.012.

MALARVANNAN, G. et al. Dynamics of persistent organic pollutants in obese adolescents during weight loss. *Environment International* [online]. 2018, 110, 80–87. ISSN 1873-6750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2017.10.009.

MALETÍNSKÁ, L. et al. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Regulatory Peptides* [online]. 2006 Sep 11; 136(1–3), 58–63. ISSN 0167-0115. Dostupné z: doi:10.1016/j.regpep.2006.04.020. PMID: 16782213.

MANGUM, L.H., HOWELL, G.E. a J.E. CHAMBERS. Exposure to p,p'-DDE enhances differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a model of sub-optimal differentiation. *Toxicol Lett* [online]. 2015 Oct 14;238(2):65-71. Dostupné z doi: 10.1016/j.toxlet.2015.07.009.

MANSFIELD, J., MOGER, J., GREEN, E., MOGER, Ch. a C.P. WINLOVE. Chemically specific imaging and in-situ chemical analysis of articular cartilage with stimulated Raman scattering. *Journal of Biophotonics* [online]. 2013, 6(10), 803–814. ISSN 1864-0648. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.201200213.

MARUSHKA, L. et al. Association between fish consumption, dietary omega-3 fatty acids and persistent organic pollutants intake, and type 2 diabetes in 18 First Nations in Ontario, Canada. *Environmental Research* [online]. 2017, 156, 725–737. ISSN 1096-0953. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2017.04.034.

MATYSKOVÁ, R., MALETÍNSKÁ, L., MAIXNEROVÁ, J., PIRNÍK, Z., KISS A. a B. ŽELEZNÁ. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online]. 2008, 57(5), 727–734. ISSN 0862-8408.

MORAK, M. et al. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. *Molecular & cellular proteomics: MCP* [online]. 2012, 11(12), 1777–1789. ISSN 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.015743.

MORITA, K., OGATA, M. a T. HASEGAWA. Chlorophyll derived from Chlorella inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2001 Mar;109(3):289-94. ISSN 0091-6765. Dostupné z doi: 10.1289/ehp.01109289. PMID: 11333191.

MRÁZ, M. et al. [Potential sources of phthalates and bisphenol A and their significance in the development of metabolic diseases]. *Cas Lek Cesk* [online]. 2016, 155(3), 11–15. ISSN 0008-7335.

MÜLLEROVÁ, D. a J. KOPECKÝ. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online]. 2007, 56(4), 375–381. ISSN 0862-8408. PMID: 16925464.

MÜLLEROVÁ, D. et al. *Obezita – prevence a léčba*. 1. vydání. Praha: Mladá fronta a.s., 2009. 261 s. ISBN 978-80-204-2146-3.

MÜLLEROVÁ, D. et al. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2014. 254 s. ISBN 978-80-246-2510-2.

MÜLLEROVÁ, D. et al. DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied*

Biomedicine [online]. 2016, 14(2), 113–117. ISSN 1214-021X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jab.2016.01.002.

MÜLLEROVÁ, D. et al. Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiological Research*. 2017 Sep 22; 66(4), 653–662. ISSN 1802-9973. PMID: 28406693.

MURPHY, S., MARTIN, S. a R.G. PARTON. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2009 Jun; 1791(6):441-7. ISSN 1388-1981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2008.07.004. PMID: 18708159.

MUSCOGIURI, G., BARREA, L., LAUDISIO, D., SAVASTANO, S. a A. COLAO. Obesogenic endocrine disruptors and obesity: myths and truths. *Archives of Toxicology* [online]. 2017 Nov; 91(11), 3469–3475. ISSN 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-017-2071-1.

MUSTIELES, V. et al. Human adipose tissue levels of persistent organic pollutants and metabolic syndrome components: Combining a cross-sectional with a 10-year longitudinal study using a multi-pollutant approach. *Environment International* [online]. 2017 Jun; 104:48–57. ISSN 1873-6750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2017.04.002.

NAKANO, S., TAKEKOSHI, H. a M. NAKANO. Chlorella (*Chlorella pyrenoidosa*) supplementation decreases dioxin and increases immunoglobulin a concentrations in breast milk. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2007 Mar;10(1):134-42. ISSN 1096-620X. Dostupné z doi: 10.1089/jmf.2006.023. PMID: 17472477.

NEEL, B.A. a R.M. SARGIS. The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* [online]. 2011, 60(7), 1838–1848. ISSN 1939-327X. Dostupné z: doi:10.2337/db11-0153.

NEWBOLD, R.R., PADILLA-BANKS, E. a W.N. JEFFERSON. Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2009, 304(1–2), 84–89. ISSN 1872-8057. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2009.02.024.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2002, 123(3), 333–339. ISSN 1470-1626. PMID: 11882010.

PEDERSEN, D.J. et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab.* [online]. 2015 May 1;4(7):507-18. Dostupné z doi: 10.1016/j.molmet.2015.04.003.

PENNO, A., HACKENBROICH, G. a Ch. THIELE. Phospholipids and lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2013 Mar; 1831(3):589–594. ISSN 1388-1981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2012.12.001.

PESTANA, D. et al. Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Sci Rep.* [online]. 2017 Jun 1;7(1):2738. Dostupné z doi: 10.1038/s41598-017-02885-9.

PEŠTA, M. et al. Trends in gene expression changes during adipogenesis in human adipose derived mesenchymal stem cells under dichlorodiphenyldichloroethylene exposure. *Molecular & Cellular Toxicology* [online]. 2018, 14:369-379. Dostupné z doi: 10.1007/s13273-018-0041-1.

PHINNEY, D.G. a D.J. PROCKOP. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2007 Nov; 25(11), 2896–2902. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2007-0637.

PSHENICHNYUK, S.A. a A. MODELLI. Can mitochondrial dysfunction be initiated by dissociative electron attachment to xenobiotics? *Physical chemistry chemical physics: PCCP* [online]. 2013, 15(23), 9125–9135. ISSN 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/c3cp50614b.

PUCHE, J.E., SAIMAN, Y. a S.L. FRIEDMAN. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology* [online]. 2013, 3(4), 1473–1492. ISSN 2040-4603. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c120035.

RICKEN, R. et al. Leptin serum concentrations are associated with weight gain during lithium augmentation. *Psychoneuroendocrinology* [online]. 2016, 71, 31–35. ISSN 1873-3360. Dostupné z: doi:10.1016/j.psyneuen.2016.04.013.

ROBENEK, H., LORKOWSKI, S., SCHNOOR, M. a D. TROYER. Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, 280(7), 5789–5794. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M407194200.

ROINGEARD, P. a R.C.N. MELO. Lipid droplet hijacking by intracellular pathogens. *Cellular Microbiology* [online]. 2017, 19(1). ISSN 1462-5822. Dostupné z: doi:10.1111/cmi.12688.

RUPRICH, J. *Dietární expozice člověka* [online]. Státní zdravotní ústav. Praha, 2009. [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://czvp.szu.cz/monitor/tds09c/tds09c.htm>.

RUSSELL, T.D. et al. Adipophilin regulates maturation of cytoplasmic lipid droplets and alveolae in differentiating mammary glands. *Journal of Cell Science* [online]. 2011, 124(Pt 19), 3247–3253. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.082974.

SHEGUNOVA, P., KLÁNOVÁ, J. a I. HOLOUBEK. Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)* [online]. 2007, 146(1), 257–261. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2006.03.057. PMID: 17045372.

SHEN, W.J., SRIDHAR, K., BERNLOHR, D.A. a F.B. KRAEMER. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*[online]. 1999 May 11;96(10), 5528–5532. ISSN 0027-8424. PMID: 10318917.

SHEN, W.J., AZHAR, S. a F.B. KRAEMER. Lipid droplets and steroidogenic cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2016 Jan 15;340(2):209-14. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.11.024.

SCHNEIDER, M.R., ZHANG, S. a P. LI. Lipid droplets and associated proteins in the skin: basic research and clinical perspectives. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2016, 308(1), 1–6. ISSN 1432-069X. Dostupné z: doi:10.1007/s00403-015-1599-2.

SCHULDINER, M. a M. BOHNERT. A different kind of love - lipid droplet contact sites. *Biochimica Et Biophysica Acta Mol Cell Biol Lipids* [online]. 2017 Oct; 1862(10 Pt B):1188-1196. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2017.06.005.

SIMULA, L. a S. CAMPELLO. Monitoring the Mitochondrial Dynamics in Mammalian Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2018; 1782: 267–285. ISSN 1940-6029. PMID: 29851005.

SORG, O. AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicology Letters* [online]. 2014 Oct 15; 230(2), 225–233. ISSN 1879-3169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2013.10.039. PMID: 24239782.

SVAČINA, Š., SUCHARDA, P., STRÁNSKÁ, Z. a M. MATOULEK. [Perspective of obesity pharmacotherapy]. *Cas Lek Cesk.* [online]. 2014; 153(3), 127–130. ISSN 0008-7335. PMID: 24968289.

ŠIMJÁK, P. et al. The role of obesity and adipose tissue dysfunction in gestational diabetes mellitus. *The Journal of Endocrinology* [online]. 2018 Aug; 238(2):R63-R77. ISSN 1479-6805. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-18-0032. PMID: 29743342.

TACHIBANA, T. et al. Histocytological specificities of adrenal cortex in the New World Monkeys, *Aotus lemurinus* and *Saimiri boliviensis*. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* [online]. 2016 Jan; 78(1):161-5. ISSN 1347-7439. Dostupné z: doi:10.1292/jvms.15-0290. PMID: 26321299.

TAKAHASHI, K. a S. YAMANAKA. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* [online]. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Dostupné z doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. PMID: 16904174.

TANG, Q.Q. a M.D. LANE. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* [online]. 2012;81:715-36. Dostupné z doi: 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.

TANG-PÉRONARD, J.L. et al. Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls. *Environmental Research* [online]. 2015 Oct; 142:407–413. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2015.07.009.

TAPPY, L. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *The Journal of Experimental Biology* [online]. 2018 Mar 7;221(Pt Suppl 1). ISSN 1477-9145. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.164202.

TAUCHI-SATO, K., OZEKI, S., HOUJOU, T., TAGUCHI, R. a T. FUJIMOTO. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002 Nov 15; 277(46), 44507–44512. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M207712200.

TCHKONIA, T. et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 2005 Jan;288(1):E267-77. Dostupné z doi: 10.1152/ajpendo.00265.2004. PMID: 15383371.

TIRINATO, L. et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) [online]. 2015 Jan; 33(1), 35–44. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1837.

ULDRY, M., YANG, W., St-Pierre, J., LIN, J., SEALE, P. a B.M. SPIEGELMAN. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown

fat differentiation. *Cell Metab* [online]. 2006 May;3(5):333-41. Dostupné z doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.002.

URBAN, H. a Ch.B. LITTLE. The role of fat and inflammation in the pathogenesis and management of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* [online]. 2018 May 1;57(suppl_4), iv10-iv21. ISSN 1462-0332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kex399. PMID: 29444323.

VALENCAK, T.G., OSTERRIEDER, A. a T.J. SCHULZ. Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biology* [online]. 2017 Aug; 12:806–813. ISSN 2213-2317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2017.04.012.

VERROTTI, A., D'EGIDIO, C., MOHN, A., COPPOLA, G. a F. CHIARELLI. Weight gain following treatment with valproic acid: pathogenetic mechanisms and clinical implications. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* [online]. 2011 May; 12(5): e32-43. ISSN 1467-789X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00800.x.

VILLA, S., MIGLIORATI, S., MONTI, G.S., HOLOUBEK, I. a M. VIGHI. Risk of POP mixtures on the Arctic food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2017 May; 36(5), 1181–1192. ISSN 1552-8618. Dostupné z: doi:10.1002/etc.3671.

WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology* [online]. 2005 Nov; 33(11): 1402–16. ISSN 0301-472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2005.07.003.

WALTHER, T.C. a R.V. FARESE. The life of lipid droplets. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2009, 1791(6), 459–466. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2008.10.009.

WANG, H., LEI, M., HSIA, R. a C. SZTALRYD. Analysis of lipid droplets in cardiac muscle. *Methods in Cell Biology* [online]. 2013, 116, 129–149. ISSN 0091-679X. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-408051-5.00008-5.

WATANABE, M., INUKAI, K., KATAGIRI, H., AWATA, T., OKA, Y. a S. KATAYAMA. Regulation of PPAR gamma transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* [online]. 2003 Jan 10;300(2):429-36. PMID: 12504102.

WATT, J. a J.J. SCHLEZINGER. Structurally-diverse, PPAR γ -activating environmental toxicants induce adipogenesis and suppress osteogenesis in bone marrow mesenchymal

stromal cells. *Toxicology* [online]. 2015, 331, 66–77. ISSN 1879-3185. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2015.03.006.

WELTE, M.A. Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2009, 37(Pt 5), 991–996. ISSN 1470-8752. Dostupné z: doi:10.1042/BST0370991.

WELTE, M.A. Expanding roles for lipid droplets. *Current biology: CB* [online]. 2015 Jun 1;25(11): R470-481. ISSN 1879-0445. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2015.04.004.

WESSELINK, A. et al. Maternal dioxin exposure and pregnancy outcomes over 30 years of follow-up in Seveso. *Environment International* [online]. 2014, 63, 143–148. ISSN 1873-6750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2013.11.005.

WHO. *Obesity – Data and statistics* [online]. Geneva, Switzerland: World Health Organization. © 2018 WHO. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>.

WHO. *The top 10 causes of death* [online]. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 24.5.2018 © 2018 WHO. [cit. 2018-07-17]. Dostupné z: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

WILFLING, F., HAAS, J.T., WALTHER, T.C. a R.V. FARESE. Lipid droplet biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2014, 29, 39–45. ISSN 1879-0410. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2014.03.008.

WILSON, J. et al. Do persistent organic pollutants interact with the stress response? Individual compounds, and their mixtures, interaction with the glucocorticoid receptor. *Toxicol Lett.* [online]. 2016 Jan 22;241:121-32. Dostupné z doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.014.

WILSON-FRITCH, L. et al. Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone. *Mol Cell Biol.* [online]. 2003 Feb; 23(3): 1085–1094. Dostupné z doi: 10.1128/mcb.23.3.1085-1094.2003.

XU, W., WANG, X. a Z. CAI. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. *Analytica chimica acta* [online]. 2013, 790, 1–13. ISSN 1873-4324. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.04.026.

YANG, F., DAI, Y., MIN, C. a X. LI. Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. *Nutrition & Metabolism* [online]. 2018, 15, 30. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s12986-018-0272-0.

YANG, Ch., KONG, A.P.S., CAI, Z. a A.C.K. CHUNG. Persistent Organic Pollutants as Risk Factors for Obesity and Diabetes. *Current Diabetes Reports* [online]. 2017, 17(12), 132. ISSN 1539-0829. Dostupné z: doi:10.1007/s11892-017-0966-0.

ZALATA, A.A., LAMMERTIJN, N., CHRISTOPHE, A. a F.H. COMHAIRE. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* [online]. 1998 Oct; 21(5):289-94. Dostupné z doi: 10.1007/s13353-013-0173-x. PMID: 24078518.

ZHANG, Y., MARSBOOM, G., TOTH, P.T. a J. REHMAN. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS One* [online]. 2013 Oct 18;8(10), e77077. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0077077.

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Fenotypy obezity,	13
Obrázek 2 – Žebříček deseti celosvětově nejčastějších příčin úmrtí v roce 2016,	17
Obrázek 3 – Hlavní morfologické charakteristiky bílých, hnědých a béžových adipocytů,22	
Obrázek 4 - Tukové kapénky v různých buněčných typech.....	27
Obrázek 5 - Struktura tukové kapénky,	28
Obrázek 6 - Životní cyklus tukové kapénky,.....	32
Obrázek 7 - Histologický obraz tkání u patologických stavů spojených s tukovými kapénkami.....	37
Obrázek 8 – Rozdělení buněčných kultur podle složení diferenciacního média.....	54
Obrázek 9 - Mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně	59
Obrázek 10 - Mesenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně	60
Obrázek 11 - Změny obsahu tukových kapének v průběhu diferenciacce mesenchymálních kmenových buněk derivovaných z tukové tkáně.....	61
Obrázek 12 - Kvantifikace lipidů uvnitř buněk v průběhu diferenciacce	62
Obrázek 13 - Viabilita buněk v průběhu diferenciacce měřená pomocí metody PrestoBlue	63
Obrázek 14 – Imunofluorescenční průkaz proteinu FABP4 v den 0 diferenciacce	64
Obrázek 15 – Imunofluorescenční průkaz proteinu FABP4 v den 21 diferenciacce	64
Obrázek 16 - Mitochondriální síť zvýrazněná pomocí barviva MitoTracker™.....	65
Obrázek 17 - Změny exprese genu OCT4 v průběhu diferenciacce	66
Obrázek 18 - Změny exprese genu PPARC v průběhu diferenciacce	67
Obrázek 19 - Změny exprese genu PPARC1B v průběhu diferenciacce	67
Obrázek 20 - Změny exprese genu INSR v průběhu diferenciacce	68
Obrázek 21 - Změny exprese genu AKT2 v průběhu diferenciacce	68
Obrázek 22 - Změny exprese genů LIPE, ACLY a FASN v průběhu diferenciacce	69
Obrázek 23 - Souvislost signální dráhy insulínu s adipogenezí a metabolismem lipidů, ...	71
Obrázek 24 - Změny exprese genu OCT4 v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE.....	72
Obrázek 25 - Změny exprese genu PPARC1B v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE	73
Obrázek 26 - Změny exprese genu PPARC v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE	73
Obrázek 27 - Změny exprese genu INSR v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE.....	74
Obrázek 28 - Změny exprese genu AKT2 v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE.....	74
Obrázek 29 - Změny exprese genu LIPE v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE.....	75
Obrázek 30 - Změny exprese genu ACLY v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE	76
Obrázek 31 - Změny exprese genu FASN v průběhu diferenciacce pod vlivem DDE.....	76

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Hlavní příčiny vzniku obezity,	11
Tabulka 2 - Klasifikace hmotnosti podle BMI,	12
Tabulka 3 - Přehled nejdůležitějších známých proteinových hormonů produkovaných tukovou tkání,	20
Tabulka 4 - Příklady výskytu tukových kapének a jejich funkce v různých buněčných typech	26
Tabulka 5 - PAT proteiny	34
Tabulka 6 - Patologické stavy asociované s dysfunkcí tukových kapének,	36
Tabulka 7 - Skupiny látek patřící mezi perzistentní organické polutanty	42
Tabulka 8 - Skupiny látek patřící mezi perzistentní organické polutanty	43
Tabulka 9 - Souhrn obezogenních účinků endokrinních disruptorů,	45
Tabulka 10 - Obsah perzistentních organických polutantů v lidské tukové tkáni,	47
Tabulka 11 - Sledované referenční geny a geny monitorující diferenciaci,	57
Tabulka 12 - Sledované geny regulace metabolismu glukózy a lipidů,	58

Seznam příloh

Příloha I:

MÜLLEROVÁ, D., MATĚJKOVÁ, D., DVOŘÁKOVÁ, J., MÜLLER, L., ROSMUS, J. a K. KOVÁŘOVÁ. Persistent organochlorine pollutants in obese women after diet induced weight loss: five years follow up study. *Central European Journal of Public Health* [online]. 2015 Sep;23(3):214-217. Dostupné z doi: 10.21101/cejph.a4100. PMID: 26615652.

Příloha II:

DVOŘÁKOVÁ, J., KRIPNEROVÁ, M., ČEDÍKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KULDA, V., PEŠTA, M., KRÁLÍČKOVÁ, M. a D. MÜLLEROVÁ. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vznik metabolického syndromu. *Chemické listy*, 2015(109):418-423. ISSN 0009-2770.

Příloha III:

MÜLLEROVÁ, D., PEŠTA, M., ČEDÍKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J., KULDA, V., SRBECKÁ, K., MÜLLER, L., DVOŘÁK, P., KRIPNEROVÁ, M., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V. a J. KUNCOVÁ. DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2016 Apr 14;113-117. Dostupné z doi: 10.1016/j.jab.2016.01.002. ISSN 1214-021X.

Příloha IV:

ČEDÍKOVÁ, M., KRIPNEROVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J., PITULE, P., GRUNDMANOVÁ, M., BABUŠKA, V., MÜLLEROVÁ, D. a J. KUNCOVÁ. Mitochondria in White, Brown and Beige Adipocytes. *Stem Cells International* [online]. 2016;2016:6067349. doi: 10.1155/2016/6067349. PMID: 16791199.

Příloha V:

MÜLLEROVÁ, D., PEŠTA, M., DVOŘÁKOVÁ, J., ČEDÍKOVÁ, M., KULDA, V., DVOŘÁK, P., BOUCHALOVÁ, V., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KUNCOVÁ, J., LANGMAJEROVÁ, J. a L. MÜLLER. Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiological Research* [online]. 2017 Sep 22;66(4):653-662. PMID: 28406693.

Příloha VI:

PEŠTA, M., ČEDÍKOVÁ, M., DVOŘÁK, P., DVOŘÁKOVÁ, J., KULDA, V., SRBECKÁ, K., MÜLLER, L., BOUCHALOVÁ, V., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KUNCOVÁ, J. a D. MÜLLEROVÁ. Trends in gene expression changes during adipogenesis in human adipose derived mesenchymal stem cells under dichlorodiphenyldichloroethylene exposure. *Molecular & Cellular Toxicology* [online]. 2018 Oct 14(4):369-379. Dostupné z doi: 10.1007/s13273-018-0041-1.

Příloha VII:

DVOŘÁKOVÁ, J., ČEDÍKOVÁ, M., MALEČKOVÁ, A., KULDA, V., TONAR, Z. a D. MÜLLEROVÁ. Vznik a vývoj tukové kapénky a její role ve zdraví a nemoci. *Časopis lékařů českých* [online]. 2018; 157(5):254-262. PMID: 30441938.

PŘÍLOHA I

MÜLLEROVÁ, D., MATĚJKOVÁ, D., DVOŘÁKOVÁ, J., MÜLLER, L., ROSMUS, J. a K. KOVÁŘOVÁ. Persistent organochlorine pollutants in obese women after diet induced weight loss: five years follow up study. *Central European Journal of Public Health* [online]. 2015 Sep;23(3):214-217. Dostupné z doi: 10.21101/cejph.a4100. PMID: 26615652.

PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS IN OBESE WOMEN AFTER DIET INDUCED WEIGHT LOSS: FIVE YEARS FOLLOW UP STUDY

Dana Müllerová^{1,2}, Dagmar Matějková², Jana Dvořáková¹, Luděk Müller³, Jan Rosmus⁴, Kateřina Kovářová²

¹Department of Public Health, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

²1st Medical Department, Charles University Medical School and Faculty Hospital in Pilsen, Pilsen, Czech Republic

³European Centre of Excellence, New Technologies for Information Society, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Pilsen, Czech Republic

⁴Department of Chemistry, State Veterinary Institute, Prague, Czech Republic

SUMMARY

Aim: Persistent organochlorine pollutants (POPs) from the environment are still bioaccumulating in human tissues. The aim of our study was to analyze the development of plasma POPs levels in obese women in relationship with their weight loss success in five year follow-up study.

Methods: 20 obese women aged 25–73 years were studied just before and after having completed a 3 month controlled low calorie diet (LCD) intervention (5 MJ daily), and again after 6 and 60 months since the beginning of the study. Body weight and plasma levels of 7 POPs were measured: polychlorinated biphenyls (PCB) 153, 138, 180; 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethylene (p,p'-DDE); 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (p,p'-DDT), hexachlorocyclohexene (HCB), hexachlorocyclohexane β (HCH β).

Results: Data shows that after 3 months of a completely controlled restrictive diet regimen, the weight loss was associated with an increase in POP plasma levels. However, after a five year follow-up, there were no differences in POPs plasma levels between those who kept losing weight or maintained the initial weight (WLM) and the group of weight gainers (WG), except for HCB where the WG had a significantly higher level ($p < 0.05$).

Conclusions: These results suggest that contrary to the long-term weight gain, the long-term weight loss or weight maintenance caused by diet restriction is associated with lower plasma levels of HCB.

Key words: persistent organic pollutants, hexachlorocyclohexene, low calorie diet, body weight changes

Address for correspondence: D. Müllerová, Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen, Department of Public Health and Preventive Medicine, Lidická 4, 301 66 Pilsen, Czech Republic. E-mail: dana.mullerova@lfp.cuni.cz

INTRODUCTION

Persistent organochlorine pollutants (POPs), organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) are synthetic chemicals that have been released into the environment in hundreds of metric tons for many years and have been used in diverse applications such as industry and agriculture. Although they were banned in most countries, their residues are still widespread in the environment. Because of their high lipophilicity and structural stability, they still can be found accumulated in biological systems. They show a carcinogenic and an endocrine disruption potential. Recently, based on epidemiological studies, there has been concern about their speculated association with metabolic disturbances like diabetes mellitus type 2, rheumatoid arthritis, disturbances of cognitive function, etc. Contaminated food, especially fatty fish, meat and milk products, is still a main source of the exposure of general population (1).

Among chlorinated pesticides, p,p'-DDT has been used most extensively. Its metabolite p,p'-DDE together with hexachlorocyclohexene (HCB) are, at the present day, the most frequently prevalent residues in the adipose tissue of humans (2).

PCBs form a subgroup of halogenated aromatic hydrocarbons. There are theoretically 209 single congeners. They have been

used, to a great extent, in diverse technical applications from the 1930s to the 1970s (3). Despite production bans in many industrial countries in the 1970s and 1980s, about 113 different PCB congeners were still detectable in the environment in 1998 (4). Their concentration in human tissue is generally monitored by using examinations of human breast milk and data from Europe show their decreased concentration. 'Non-dioxin-like' PCB 153, 138, and 180 are the main congeners which show the highest concentration and are most frequently found in breast milk (5). In the former Czechoslovakia, PCB was marketed as technical mixtures under the trade name "Delor" produced in the amount of about 21,500 tons in Eastern Slovakia from 1959 to 1984, when the production was finally abolished (6). About 11,600 tons were used inside the former Czechoslovakia (7). Therefore, the industrial areas of the Czech Republic have one of the highest PCB burdens of all European countries (8).

After human exposure, POPs are accumulated in the body, especially in the adipose tissue. They have relatively long half-lives before disappearing from the tissue or from the body. The variability of the stored amount depends on dietary exposure (food habits, and the quality and quantity of POPs in available food) and on individual disposition to store these substances (genetic traits and size of adipose tissue and its dynamic changes) (9). Their

distribution in the body is affected by changes in body weight. Weight loss resulted in an acute increase of their concentration in reduced adipose tissue, brain, and serum/plasma without changing the total amount, as it was documented in case of hexachlorocyclohexane (HCH) (10). However, dramatic weight loss, which occurred as a consequence of bariatric surgery treatment, showed not only an increased level of serum and adipose tissue POPs concentrations together with a reduced amount of white adipose tissue, but a decreased total body burden for POPs after 12 months post-surgery as well (11). The objective of our study was to analyze in five year follow up study the development of plasma POPs levels in obese women in relationship to their weight loss success, caused by restrictive diet regimen.

MATERIALS AND METHODS

Twenty obese adult women, aged 25–73 years (BMI > 30 kg/m²) were randomly selected from the patients of the Centre for Obesity Treatment (Faculty Hospital in Pilsen, Czech Republic) during their first visit in 2006. Informed consent was obtained from all patients involved in the study. Anthropometry: body weight (BW) and height were measured, and a plasma analysis of 7 POPs (p,p'-DDE, p,p'-DDT, HCB, HCH β , PCB 153, 138, 180) was performed in all the subjects. Obese patients were studied just before (Time 1, T1) and after the 3 month (Time 2, T2) of low calorie diet (LCD) intervention (5 MJ daily, protein 20% of total energy, fat 25–30% of total energy). Their diaries were checked on a monthly basis using nutritional software NutriDan 1.2 (DADI Ltd., Pilsen, 2002, Czech Republic). After that period they were instructed to continue their diet and were checked again 6 months (Time 3, T3) and 60 months (Time 4, T4) after the beginning of the study.

Venous blood was collected in time T1, T2, T3, and T4 from fasted (12 hours) subjects between 7.00 a.m. and 10.00 a.m. Plasma samples were divided into 50 μ l aliquots and stored at

-80°C for subsequent analysis of PCB 153, 138, 180, p,p'-DDE, p,p'-DDT, HCH β and HCB. Plasma levels of these pollutants were determined by a high resolution gas chromatography with electron capture detection (HRGC/ μ ECD; Agilent Technologies 6890 Series, Palo Alto, CA, USA), Capillary Column DB-5 (0.25 mm x 60 m x 0.25 μ m); J&W Scientific, USA (12). The values (in ng/kg fat) of the detection limit (LOD) were the following: PCB 153 (<20), PCB 138 (<60), PCB 180 (<40); p,p'-DDE (<10); p,p'-DDT (<50), HCB (<20), HCH β (<40).

Statistics

POPs concentration values below the detection limit were treated as one-half the value of the detection limit (LOD). The descriptive statistics including the median and range (minimum–maximum) were calculated only for the congeners detected in at least 50% of samples.

Due to the not normal distribution of most of the examined variables, the non-parametric Wilcoxon Rank-Sum Test was performed to compare the POP concentration increase during a 60 month period between WG and WLM groups. All statistical computations were performed with the MATLAB Statistics Toolbox.

We certify that all applicable institutional and governmental regulations concerning the ethical use of human volunteers were followed during this research. The approval of the protocol examination was authorized by the Medical School and Faculty Hospital Ethics Committee in Pilsen.

RESULTS

Basic characteristics of plasma concentration development of each measured POP in whole sample during the five-year follow up are summarized in Table 1, BW development in Table 2. During this time, i.e. from 2006 to 2011, only plasma levels of HCH β and DDT decreased. The median and range of all others

Table 1. Development of plasma concentration of PCB congeners and chlorinated pesticides/metabolites; (n = 20)

	T1	T2	T3	T4
HCH-beta	20	570	350	230
	20–2,390	140–4,370	170–5,350	100–440
HCB	175	450	270	935
	10–880	40–2,440	120–1,570	100–4,470
p,p'-DDE	160	385	27	1,435
	5–700	100–1,500	150–1,410	210–8,180
p,p'-DDT	25	46	41	100
	25–1,740	37–610	41–410	100–290
PCB 138	30	150	160	705
	30–140	80–340	110–330	350–1,110
CB 153	140	190	205	780
	10–500	60–620	130–420	280–1,260
CB 180	20	110	90	765
	20–140	60–180	70–230	150–1,520

Median; minimum–maximum, expressed in ng/kg. T1 – initial measurement, prior diet restriction, T2 – measurement after 3 months of LCD intervention, T3 – measurement after 6 months from the beginning of the study, T4 – measurement after 60 months from the beginning of the study

Table 2. Development of body weight

T1	T2	T3	T4
108.2	101.6	99	108.8
82.8-130.5	74.7-118.5	73-115	77.9-120.4

Median, minimum-maximum, expressed in kg. T1 – initial measurement, prior diet restriction, T2 – measurement after 3 months of LCD intervention, T3 – measurement after 6 months from the beginning of the study, T4 – measurement after 60 months from the beginning of the study

examined POPs increased. The highest plasma levels detected were DDE and HCB (Fig. 1). The medians of HCB and DDE are also depicted as the central line in the box plots in Figure 3.

To show the dependency of the increase of pollutant concentration between T4 a T1 on relative weight growth, the linear regression of the increase of pollutant concentration $(POP_{T4} - POP_{T1}) \cdot 10^6$ on relative weight growth $(BW_{T4} - BW_{T1}) / BW_{T1} \cdot 100$ is represented in Fig. 2.

Depending on body weight difference between time 4 and time 1, the sample was divided into two cohorts: women whose BW decreased or remained relatively stable $(BW_{T4} - BW_{T1} < 1.5$ kg) (weight losers/maintainers – WL/M, N=11); and the others

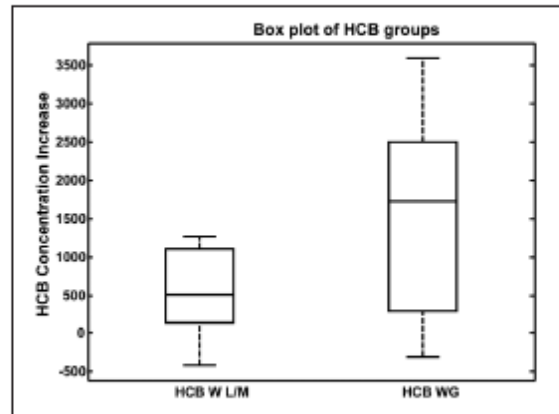


Fig. 3. The box plot of HCB, in ng/kg lipids; median is depicted as the central line. $p < 0.05$, Wilcoxon's test

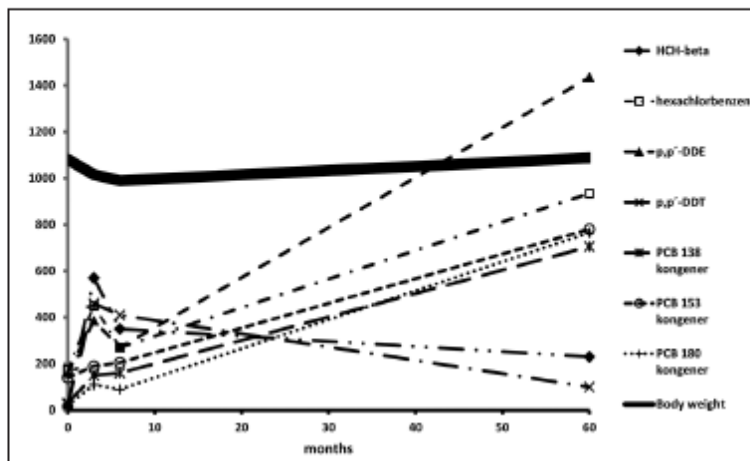


Fig. 1. The development of plasma POPs levels (medians, in ng/kg lipids) and body weight (in kg · 10) during five-year follow-up.

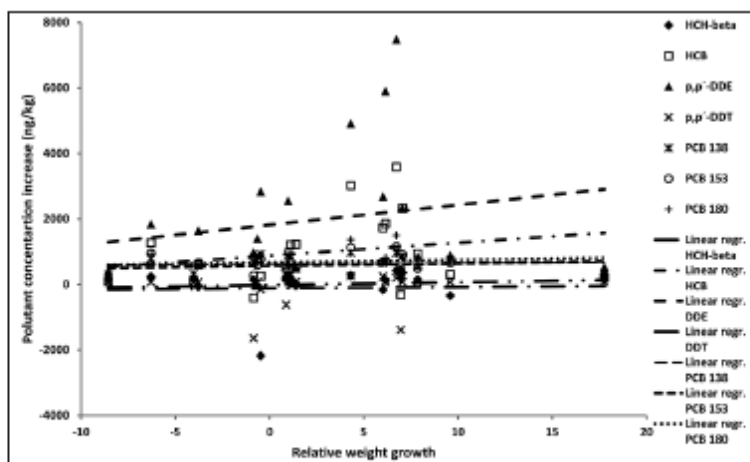


Fig. 2. The linear regression of the increase of pollutant concentration $(POP_{T4} - POP_{T1}) \cdot 10^6$ on relative weight growth $(BW_{T4} - BW_{T1}) / BW_{T1} \cdot 100$.

(weight gainers WG, N=9). WL/M had lower plasma level of HCB in comparison to WG in T4 ($p < 0.05$), although they did not differ in T1 (Table 2, Fig. 3). A similar tendency, however without statistical significance ($p < 0.1$), was also observed in DDE. Some tendency was also observed for other POPs but without statistical significance ($p > 0.1$). These results suggest that long term weight loss or weight maintenance tend to be positively associated with a lower plasma level of HCB contrary to the HCB plasma level in weight gainers.

DISCUSSION

During a five years follow up study from 2006 to 2011, there were increased medians levels of 5 from 7 examined POPs. Many studies confirmed age as a predictor of POPs levels (13, 14). In case of body weight and body composition maintenance, the increase of POPs plasma levels is the result of an imbalance between increased body burden from everyday exposure to food and their slower degradation and elimination from the body. Taking into account that biological half-time of many POPs is around ten years; there is a high probability of an accumulation of these POPs in the body, especially in lipophilic tissue. Intergeneration differences along with the gradual reduction of body burden, reflect a gradual decrease of background exposure from the environment as a result of the Stockholm Convention (15). It depends on the amount of particular POP which has been released into the environment and also on its chemical properties for degradation. Based on our data, only DDT and HCH β have been reduced during the five-year follow up study. The situation in POPs body distribution is more complicated with the changing of the fat/fat-free mass compartments, as it occurs with the development of overweight and obesity. There are studies which suggest an inverse association between PCB levels and BMI gain over the last ten years (16). On the other hand, weight loss, and especially drastic weight loss, is associated with increased plasma/serum levels in the liver, brain, and in a reduced size of white adipose tissue. The knowledge of these dynamics along with total POPs body burden development is very important for an obesity treatment strategy.

CONCLUSION

The results of our study, where the subjects tried to keep life-style modification based on energy and total fat restriction in their diet, show that after 3 months of completely controlled regime, the weight loss was associated with an increase in POP plasma levels. However, after the five-year follow up, there were no differences in POPs plasma levels between the group of long-term successful WL/M and the group of WG, except for HCB where the WG had a significantly higher level.

Conflict of Interests

None declared

Sponsorship

Sponsored by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant: No. NT14330-3/2013, Polychlorinated persistent organic pollutants in the etiopathogenesis of obesity and insulin resistance

REFERENCES

1. Smeds A, Saukko P. Identification and quantification of polychlorinated biphenyls and some endocrine disrupting pesticides in human adipose tissue from Finland. *Chemosphere*. 2001 Sep;44(6):1463-71.
2. Hardell E, Carlberg M, Nordström M, van Bavel B. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993-2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci Total Environ*. 2010 Sep 15;408(20):4412-9.
3. Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*. 1994;24(2):87-149.
4. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect*. 1998 Feb; 106(Suppl 1): 11-56.
5. Bencko V, Skulová Z, Krecmerová M, Liem AK. Selected polyhalogenated hydrocarbons in breast milk. *Toxicol Lett*. 1998 Aug;96-97:341-5.
6. Pavuk M, Cerhan JR, Lynch CF, Schecter A, Petrik J, Chovancova J, Kocan A. Environmental exposure to PCBs and cancer incidence in eastern Slovakia. *Chemosphere*. 2004 Mar;54(10):1509-20.
7. Černá M, Malý M, Grabic R, Batářiiová A., Šmíd J, Beneš B. Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere*. 2008 Jul;72(8):1124-31.
8. Černá M, Bencko V, Brabec M, Šmíd J, Krsková A, Jech L. Exposure assessment of breast-fed infants in the Czech Republic to indicator PCBs and selected chlorinated pesticides: Area-related differences. *Chemosphere*. 2010 Jan;78(2):160-8.
9. Müllerová D, Kopecký J. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res*. 2007;56(4):375-81.
10. Jandacek RJ, Anderson N, Liu M, Zheng S, Yang Q, Tso P. Effects of yo-yo diet, caloric restriction, and olestra on tissue distribution of hexachlorobenzene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Feb;288(2):G292-9.
11. Kim MJ, Marchand P, Henegar C, Antignac JP, Ailli R, Poitou C, et al. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect*. 2011 Mar;119(3):377-83.
12. Karásek L, Hajslová J, Rosmus J, Hühnerfuss H. Methylsulfonyl PCB and DDE metabolites and their enantioselective gas chromatographic separation in human adipose tissues, seal blubber and pelican muscle. *Chemosphere*. 2007 Apr;67(9):522-7.
13. Covaci A, de Boer J, Ryan JJ, Voorspoels S, Schepens P. Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue. *Environ Res*. 2002 Mar;88(3):210-8.
14. Kiviranta H, Tuomisto JT, Tuomisto J, Tukiainen E, Vartiainen T. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the general population in Finland. *Chemosphere*. 2005 Aug;60(7):854-69.
15. Hardell E, Carlberg M, Nordström M, van Bavel B. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993-2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci Total Environ*. 2010 Sep 15;408(20):4412-9.
16. Bachelet D, Truong T, Verner MA, Arveux P, Kerbrat P, Charlier C, et al. Determinants of serum concentrations of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and polychlorinated biphenyls among French women in the CECILE study. *Environ Res*. 2011 Aug;111(6):861-70.

Received September 10, 2014

Accepted in revised form December 22, 2014

PŘÍLOHA II

DVOŘÁKOVÁ, J., KRIPNEROVÁ, M., ČEDÍKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KULDA, V., PEŠTA, M., KRÁLÍČKOVÁ, M. a D. MÜLLEROVÁ. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vznik metabolického syndromu. *Chemické listy*, 2015(109):418-423. ISSN 0009-2770.

VLIV PERZISTENTNÍCH ORGANICKÝCH POLUTANTŮ NA MITOCHONDRIÁLNÍ FUNKCE A VZNIK METABOLICKÉHO SYNDROMU

JANA DVOŘÁKOVÁ^a, MICHAELA KRIPNEROVÁ^b, MIROSLAVA ČEDÍKOVÁ^{c,d}, VÁCLAV BABUŠKA^e, VLASTIMIL KULDA^e, MARTIN PEŠTA^{b,d}, MILENA KRÁLÍČKOVÁ^{c,d} a DANA MÜLLEROVÁ^a

^a Ústav hygieny a preventivní medicíny, ^b Ústav biologie,

^c Ústav histologie a embryologie,

^d Biomedicínské centrum, ^e Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, Karlovarská 48, 301 00 Plzeň

miroslava.cedikova@lfp.cuni.cz

Došlo 20.2.14, přijato 27.6.14.

Klíčová slova: perzistentní organické polutanty, mitochondrie, diabetes mellitus, obezita, metabolický syndrom

Obsah

1. Úvod
2. Perzistentní organické polutanty
3. Mitochondrie a její funkce
4. Mitochondriální dysfunkce a s nimi asociovaná onemocnění
5. Závěr

1. Úvod

Perzistentní organické polutanty (POP) jsou bioakumulativní látky, toxické pro organismy¹. Jejich degradace v životním prostředí je pomalá – poločas rozpadu v půdě se pohybuje v řádu několika roků až desítek let. Jsou součástí herbicidů, insekticidů, průmyslových výrobků či průmyslových odpadů. Jsou odolné vůči fotolytické degradaci či jiné chemické nebo biologické přeměně a produkty vznikající jejich rozkladem jsou rovněž perzistentní a toxické. Do lidského organismu se dostávají především potravou. Protože jsou lipofilní, jsou transportovány kreví ve vazbě na lipoproteiny a ukládány do tukové tkáně člověka. Byly provedeny studie, které dokládají, že vznik některých onemocnění souvisí se sérovou koncentrací těchto toxických látek². Mezi tato onemocnění řadíme i diabetes mellitus 2. typu (DM2T), spojený s obezitou. Jedná se o civilizační onemocnění, jehož výskyt celosvětově vzrůstá nejen u dospělých, ale stále častěji postihuje i mladé jedince a dokonce děti. Za hlavní příčiny nárůstu obezity a meta-

bolických onemocnění se v současné době považuje obezigení životní prostředí a životní styl člověka, charakterizovaný sníženou fyzickou aktivitou a relativním nadbytkem kaloricky denzní potravy. Obezita je často sdružena i s dalšími doprovodnými onemocněními jako je hypertenze, dyslipidemie, kardiovaskulární onemocnění, v klinické medicíně souhrnně označované jako kardio-metabolický syndrom³. V současné době jsou však stále více diskutovány i další hypotézy vlivu tzv. obezogenů či metabolických disruptorů, tedy chemických látek ze zevního prostředí, které se mohou spolupodílet jak na adipogenezi, tak na metabolických poruchách ať již ve vlastní tukové tkáni, ve svalu, játrech a dalších orgánech. Mezi tyto látky patří i perzistentní organické polutanty.

2. Perzistentní organické polutanty

Do skupiny perzistentních organických polutantů (POP) se řadí velké množství látek, jako jsou: *i*) polychlorované pesticidy (OCP), *ii*) polychlorované bifenylly (PCB), *iii*) polychlorované dioxiny a dibenzofurany (PCDD a PCDF), *iv*) bromované zhášeče hoření (BFR), a *v*) další nezařazené POP, kam patří i některé polyaromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované *n*-alkany (LCCP) používané od 80. let 20. století jako náhražka PCB, některé organocinické látky (tributyltin, trifenylytin), perfluorooctansulfonylfluorid a jeho soli⁴.

Jedná se o látky lipofilního charakteru, které se váží v tukové tkáni organismů, přičemž vzhledem k jejich bioakumulativním vlastnostem jsou nejvíce ohroženi predátoři, tedy organismy na vrcholu potravního řetězce. V lidském těle se POP nachází nejvíce v tukové tkáni (tab. I), v mateřském mléce, mozku, nadledvinách a játrech⁵. V rostlinách se ve větší míře nekonzcentrují, nadzemní části rostlin však mohou být znečištěny půdou, dešťovou vodou nebo pesticidy^{6,7}.

Hlavní cestou příjmu POP je pro člověka kontaminovaná potrava. Jedná se zejména o potravu živočišného původu – tučné ryby, maso, mléko, mléčné výrobky a vejce⁸. Na obsah POP jsou hygienickými normami kladena velmi přísná kritéria. Mezi další možné vstřebávací cesty patří inhalace a dermální cesta.

POP řadíme mezi látky označované jako tzv. endokrinní disruptory (modulátory). Jejich účinkem je poškozen fyzilogický embryonální vývoj. U dospělého člověka narušují jeho reprodukční schopnosti⁹, ovlivňují zejména procesy řízené estrogény a androgény tím, že agonizují nebo naopak antagonizují jejich fyziologické funkce. V současné době se také zvažuje jejich možné působení jako obezogenů a metabolických disruptorů, tj. látek podílejících se na vzniku obezity a jejich komorbidit, zejména v podobě poruchy inzulínové rezistence a vývoje DM2T.

Tabulka I
Přehled skupin perzistentních organických polutantů a jejich obsah v bílé tukové tkáni

Skupina POP	Nacházené koncentrace		Lit.
	median [ng/g tuku]	rozmezí [ng/g tuku]	
<i>Polychlorované bifenyly (PCB)</i>			
PCB (suma 35 kong.)	841	286–1802	39
PCB 153	438	–	40
<i>Organochlorované pesticidy (OCP)</i>			
OCP (suma 7 pesticidů) ^a	1008	–	41
4,4'DDE	567	3,5–3229	41
DDT	290	47–2802	39
<i>Bromované zhášeče hoření (BFR)</i>			
PBDEs (polybromované difenylethery)	2,6/2,7 viscerální /subkutánní tuk	–	42
HBCE (hexabromcyklododekan)	4,0/3,7 viscerální /subkutánní tuk	–	42
<i>Polychlorované dioxiny a dibenzofurany (PCDD a PCDF)</i>			
PCDDs a PCDF	0,0146	0,0033–0,0554	43

^a 4,4'DDE, hexachlorobenzen, 4,4'DDT, 4,4'DDD, pentachlorobenzen, beta a gamma-hexachlorocyclohexan

Jednou z nových hypotéz možného působení je ovlivnění enzymu gama-glutamyltransferasy (GGT), který se podílí na přenosu aminokyselin z extracelulárního prostoru do buňky¹⁰ za využití glutathionu (obr. 1). Gama-glutamyltransferasa je enzym zprostředkávající transport aminokyselin a některých peptidů přes buněčnou membránu z extracelulární tekutiny do buněk. Nachází se ve tkáních, které se podílejí na absorpci a sekreci. Uplatňuje se při degradaci karcinogenů a xenobiotik. Donorem gama-glutamylového zbytku je tripeptid glutation, který chrání organismus před oxidačním stresem.

Některé studie popisují u obézních lidí vztah mezi zvýšenou sérovou hladinou GGT a vznikem DM2T, zatímco nízké nebo normální hladiny GGT vznik DM2T nepředpovídají. Pokud jde o předpověď DM2T vzhledem k sérové aktivitě GGT, zdá se, že zvýšená hladina POP má na tuto skutečnost vyšší vliv než vlastní obezita, a tedy že POP uložené v tukové tkáni mohou mít zásadní význam k pochopení patogeneze DM2T a vzniku inzulínové rezistence (obr. 2, cit.¹¹).

Mezi další rizika spojená s působením POP patří i některé další civilizační choroby jako jsou nádorová onemocnění, hypertenze, kardiovaskulární nemoci¹², ale i atopická dermatitida nebo revmatoidní artritida¹³.

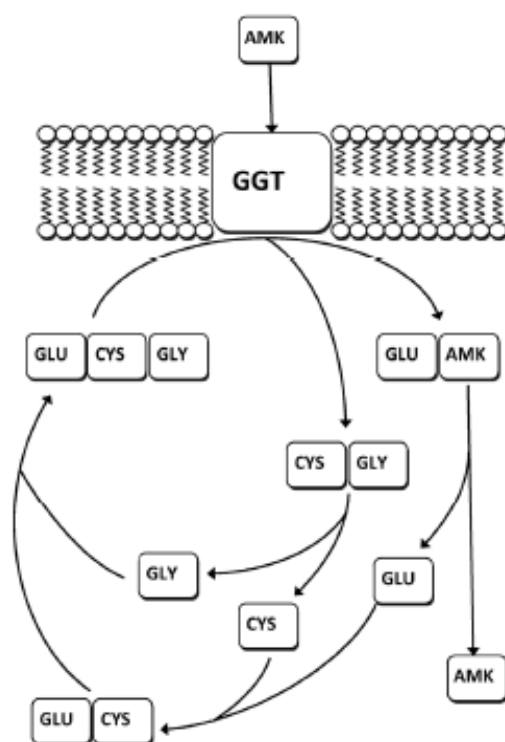
Vzhledem k tomu, že tyto látky jsou dálkově transportovány ovzdušním přesahujícím hranice států, jsou detegovány i v Arktidě a Antarktidě, tedy v oblastech tisíce kilo-

metrů vzdálených od původního zdroje znečištění, má jejich výskyt závažné dopady na životní prostředí celé planety⁸. Z ovzduší, kde se vyskytují adsorbované na prachové nebo aerosolové částice, se dostávají do půdy a do vody, čímž kontaminují potravní řetězce^{6,7}.

Jejich toxicita závisí na mnoha proměnných, včetně typu, struktury, dávky a cestě expozice. Výzkum naznačuje, že mechanismy toxicity jsou multifaktoriální a využívají jak aktivaci přes Ah receptor (AhR), tak i další nezávislé mechanismy působení. AhR je ligandem aktivovaný transkripční faktor podílející se na regulaci genové exprese, která může být při vazbě POP na tento receptor narušena. Předpokládá se, že POP se váže na receptor a poté je transportován do jádra, kde indukuje změny v genové expresi. Bylo zjištěno, že tak dochází k indukci např. CYP450 nebo glukuronyltransferasy či glutathiontransferasy^{14–16}.

Protože se jedná o látky vysoce toxické, je snaha o jejich eliminaci v životním prostředí. Z tohoto důvodu byla 23. 5. 2001 podepsána závazná mezinárodní dohoda, Stockholmská konvence, která vstoupila v účinnost v roce 2004. Jejím cílem je omezování a snižování vypouštění emisí vybraných POP. Umluvu ratifikovalo 178 zemí světa a Evropská unie¹⁷. V současné době je na seznamu této dohody 23 perzistentních látek.

Polychlorované pesticidy byly využívány pro své biocidní účinky v zemědělství po řadu let. Přestože bylo jejich používání zakázáno ve většině zemí v 70. letech



Obr. 1. Nová hypotéza působení enzymu gama-glutamyltransferasy (GGT) na přenos aminokyselin z extracelulárního prostoru do buňky za využití glutathionu. AMK – aminokyselina nebo peptid, GGT – gama-glutamyltransferasa, GLU-CYS-GLY – glutathion, GLU-AMK – gama-glutamylaminokyselina, CYS-GLY – cysteinylglycin, GLU-CYS – gama-glutamylcystein, GLU – glutamová kyselina, CYS – cystein, GLY – glycin

minulého století, jejich rezidua jsou dosud přítomna v prostředí ve velkém množství, jedná se zejména o DDE (2,2-bis(4-chlorfenyl)-1,1-dichlorethan), který je metabolitem DDT (2,2-bis(4-chlorfenyl)-1,1,1-trichlorethan). Tento metabolit se stále vyskytuje ve vysokém zastoupení i v tukové tkáni člověka. PCB byly široce využívány v nejrůznějších technických aplikacích, těchto látek je přes 200 různých kongenerů, které se podle své toxicity dělí na látky bez anebo s dioxinovým účinkem. V současné době mezi nejvíce zastoupené kongenery v tukové tkáni člověka i hospodářského dobytka patří: PCB 153, 138, 180, 170, 118, 156. Vysoký počet analytických záchytů je dále zaznamenáván rovněž u *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE a hexachlorbenzenu¹⁸. PCB vykazují neurotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky.

Dioxiny a dibenzofurany vznikají nejčastěji při spalovacích procesech. Jejich průmyslová výroba byla již zakázána. Z 210 kongenerů jich 29 vykazuje podobnou chemickou strukturu a toxické vlastnosti jako dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD).

Mezi hlavní nežádoucí účinky dioxinové toxicity pro člověka patří poškození vývoje plodu, zhoršení imunity, endometrióza a karcinogeneze. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA – European Food Safety Authority) vykazují také zvýšené riziko vzniku DM2T a kardiovaskulárních onemocnění. V těchto případech se jedná o rizika spojená s chronickou expozicí nízkým dávkám. Na druhé straně akutní expozice vysoké dávce vede k akutní otravě s projevy dramatického poklesu tělesné hmotnosti, kožními projevy, jako je hyperpigmentace a chlorakne, ev. až k úmrtí.

Bromované zpomalovače hoření kontaminovaly prostředí teprve nedávno. Jsou přidávány do mnoha výrobků s cílem zabránit hoření.

3. Mitochondrie a její funkce

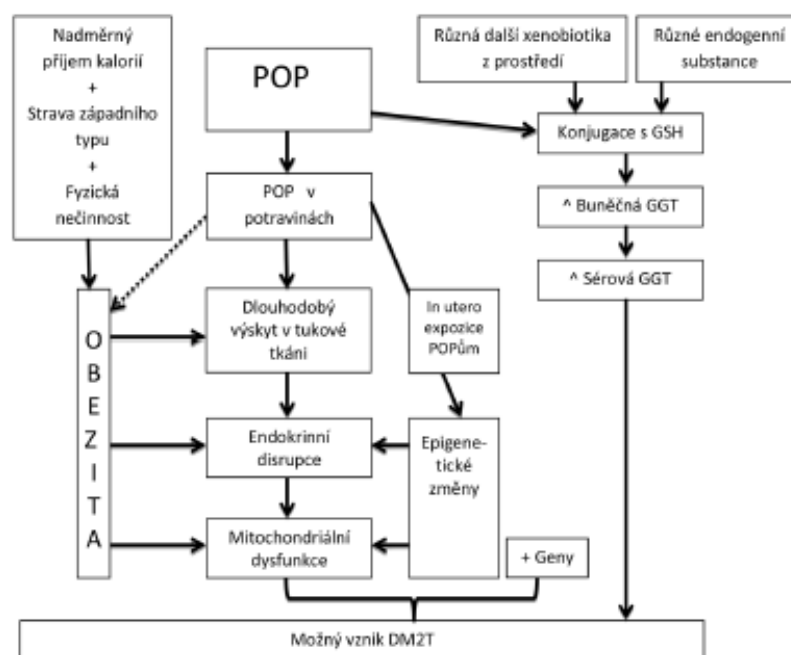
Mitochondrie je konstantní membránová organela všech živočišných buněk. Jejich počet a velikost souvisí s typem buňky a intenzitou funkcí, kterou v buňce vykonávají, mohou tak zaujímat až 20 % objemu buňky. Jejich původ není dosud zcela jednoznačně objasněn¹⁹. Převažuje však názor, že vznikají samostatně a jsou v symbióze s ostatními částmi eukaryotické buňky, protože obsahují malé množství vlastní kruhové DNA a vykazují rysy podobné bakteriím^{20,21}. Přestože je tvar a velikost mitochondrií značně různorodý, jejich vnitřní struktura je stále stejná. Je tvořena čtyřmi kompartmenty – vnější membránou, mezimembránovým prostorem, vnitřní membránou a matrix²².

Z hlediska funkce lze považovat tuto organelu jako jednu z nepostradatelných. Mitochondrie má v buňce řadu funkcí, ale nejdůležitější je získání a uvolňování energie pro činnost buňky. Tvorba energie probíhá systémem biologické oxidace substrátů (převážně oxidací pyruvátu, mastných kyselin) a oxidativní fosforylací. Vodík uvolňující se v citrátovém cyklu je v dýchacím řetězci oxidován na vodu a energii, která je získána při přenosu elektronů a je akumulována do energeticky bohaté molekuly ATP²³. Přednost molekuly ATP spočívá v její univerzálnosti a tedy možnosti vstoupit do všech buněčných pochodů.

Další a velmi důležitou funkcí mitochondrie je schopnost reagovat na aktuální stav, ve kterém se buňka nachází. V případě nutnosti spustí sebevražednou kaskádu procesů, která vyústí v zánik buňky bez negativní reakce vnějšího prostředí. Tato destrukce může být spuštěna i v důsledku vnějšího vražedného proapoptického signálu s naprosto stejným výsledným efektem^{24,25}.

4. Mitochondriální dysfunkce a s nimi asociovaná onemocnění

Mitochondriální dysfunkce může vést k akutnímu buněčnému a následně k orgánovému nebo systémovému selhání. Vzhledem k tomu, že jsou mitochondriální protei-



Obr. 2. Nová hypotéza o vzájemných vztazích mezi sérovou GGT, perzistentními organickými polutanty a diabetem mellitem 2. typu (upraveno podle Lee a spol.⁴¹).

ny kódovány jak mitochondriální DNA (mtDNA kóduje 13 genů zapojených v oxidační fosforylaci), tak jadernou nDNA, může být mitochondriální onemocnění následkem mutace v obou genomech, v jaderném i mitochondriálním genomu (mikrodelece, duplikace, rozsáhlá delece)^{26,27}. Míra možných mutací je ale u mitochondriální DNA vyšší, protože se molekula vyskytuje ve velmi blízkém kontaktu s reaktivními formami kyslíku (ROS) produkovanými oxidační fosforylací, kde není chráněna pomocí histonových proteinů²⁸. Nejnáchylnější k poškození jsou tkáně, které jsou na správné funkci mitochondrií zvláště závislé, tedy tkáně s vysokou spotřebou energie, jako je např. srdeční sval, mozek, kosterní svaly či žlázy s vnitřní sekrecí zejména pankreas, ledviny, tuková tkáň nebo štítná žláza²⁹.

V posledních letech bylo prokázáno, že snižující se mitochondriální hustota a oxidační metabolismus v různých tkáních mohou vést ke komplikacím spojených s nadváhou, obezitou a možným rozvojem DM2T či metabolického syndromu^{30,31}. Kromě porušení rovnováhy v energetickém metabolismu může za onemocněním stát řada jiných faktorů např. špatná funkce orgány, která má za následek modifikaci v metabolismu lipidů, genetické faktory, oxidační stres či redukováná biogeneze mitochondrií v důsledku stárnutí²⁷. Byla nalezena jasná souvislost mezi DM2T a mitochondriální dysfunkcí, kdy díky

mutaci v mtDNA β buněk pankreatu došlo ke zhoršení sekrece inzulínu, apoptóze buněk a následnému snížení počtu β buněk³².

Zásadní poznatek dokládající rozhodující úlohu mitochondriální dysfunkce při vzniku DM2T *in vivo* je skutečnost, že rozvoj inzulínové rezistence je často pozorován u starších lidí s omezenou činností oxidační fosforylace a u obézních jedinců se zvýšeným rizikem DM2T, které je způsobeno vysokou hladinou volných mastných kyselin, které tak negativně ovlivňují glukosový metabolismus a navozují inzulínovou rezistenci^{31,33,34}. Inzulínová rezistence adipocytů a změny v metabolismu tukové tkáně se pak propagují do dalších tkání a potencují rozvoj DM2T a metabolického syndromu^{3,5}.

Účinkem perzistentních látek může docházet ke zvýšení oxidačního stresu, zvýšení hladin zánětlivých cytokinů a následně vzniku prooxidativních podmínek, což jsou hlavní mechanismy v patogenezi chorob spojených s obezitou. Jedná se o začarovaný kruh, protože zvýšení hladin zánětlivých cytokinů je spojeno s dalším nárůstem oxidačního stresu^{35,36}. Takovéto narušení mitochondriálního systému se obvykle projeví patologickým fenotypem, jakým je obezita, hypertenze, dyslipidémie (zvýšená koncentrace lipidů nebo lipoproteinů v krvi), metabolický syndrom nebo nádorové onemocnění. Selháním správně

mitochondriální oxidace tuků může také docházet ke zvýšení oxidačního stresu, zánětlivých cytokinů a vzniku nadbytku reaktivních forem kyslíku, ty pak mohou poškodit buněčné struktury a podílet se zpětně na spuštění zánětlivé reakce spojené s inzulínovou rezistencí či metabolickým syndromem³⁷. Tyto poznatky vedly k vyslovení hypotézy, že oxidační stres by mohl být iniciální událostí v patologii těchto onemocnění³⁸. K potvrzení této hypotézy přispívají i výsledky práce¹⁵, která potvrdila zhoršení mitochondriální funkce vlivem POP s dioxinovou aktivitou a dále, že cirkulující ligandy aryluhlovodíkových receptorů (AhR) v lidském séru jsou asociovány s parametry metabolického syndromu a mitochondriální funkcí. Zvýšení hodnot 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ekvivalentu (TCDD ekv) bylo pozitivně korelováno s obezitou, krevním tlakem, sérovými triacylglyceroly a lačnou glykemií¹⁵.

5. Závěr

Řada epidemiologických studií prokazuje asociaci mezi plazmatickými hladinami POP a výskytem metabolických komplikací obezity, zejména výskytem DM2T. Tato asociace má tvar křivky „U“, kdy nízké a vysoké koncentrace POP a jejich směsi vykazují zvýšené riziko.

Mezi možné mechanismy, které by tento vztah mohly vysvětlovat, patří i vliv POP na mitochondriální dysfunkci, jež je iniciována zvýšením oxidačního stresu buněk účinkem POP. Tuto hypotézu potvrzuje zatím omezená řada prací. Jednou z nich je nalezení nepřímé závislosti mezi sérovou koncentrací TCDD ekvivalentů navázaných na AhR a ATP produkci myocytů inkubovaných v tomto médiu. Abnormální oxidativní fosforylace, společně se sníženým počtem mitochondrií, jejich abnormální morfologií a sníženou mitochondriální genovou expresí je charakteristická pro inzulínovou rezistenci a vznik DM2T. Zda se kromě zvýšené nabídky metabolických substrátů a přepnutí metabolických drah na něm podílí i zvýšená zátěž lipofilními toxickými látkami typu perzistujících organických polutantů zůstává stále předmětem dalšího výzkumu.

Tato studie je podporována projektem IGA MZ NT 14330-3/2013, operačním programem VaVpI PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076, programem rozvoje vědních oblastí Univerzity Karlovy (projekt P36) a grantem GA UK 696212.

LITERATURA

1. Kallenborn R.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 100 (2006).
2. Mullerova D., Kopecký J., Matejkova D., Muller L., Rosmus J., Racek J., Sefina F., Opatna S., Kuda O., Matejovic M.: *Int. J. Obes.* 32, 1875 (2008).
3. Després J. P., Lemieux I.: *Nature* 444, 881 (2006).
4. Kotyza J., Soudek P., Kafka Z., Vaněk T.: *Chem. Listy* 103, 540 (2009).
5. Müllerová D., Kopecký J.: *Physiol. Res.* 56, 375 (2007).
6. Holoubek I.: *Cent. Eur. J. Public Health & Suppl.* 4 (2000).
7. Holoubek I., Kocan A., Holoubková I., Hilscherová K., Kohoutek J., Falandysz J., Roots O.: *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 52, 239 (2001).
8. Xu W., Wang X., Cai Z.: *Anal. Chim. Acta* 790, 1 (2013).
9. Gregoraszczyk E. L., Ptak A.: *Int. J. Endocrinol.* 2013, 828532 (2013).
10. Lee D. H., Jacobs D. R. Jr.: *Clin. Chem.* 52, 1825 (2006).
11. Lee D. H., Steffes M. W., Jacobs D. R. Jr.: *Diabetologia* 51, 402 (2008).
12. Ha M. H., Lee D. H., Jacobs, D. R.: *Health Perspect.* 115, 1204 (2007).
13. Ochiai S., Shimojo N., Yuka I., Watanabe M., Matsuno Y., Suzuki S., Kohno Y., Mori C.: *Chemosphere* 94, 48 (2014).
14. Kim J. T., Kim S. S., Jun D. W., Hwang H. Y., Park W. H., Pak Y. K., Lee H. K.: *J. Diabetes Investig.* 4, 483 (2013).
15. Park W. H., Jun D. W., Kim J. T., Jeong J. H., Park H., Chang Y. S., Park K. S., Lee H. K., Pak Y. K.: *BioFactors Oxf. Engl.* 39, 494 (2013).
16. Zhou H., Wu H., Liao C., Diao X., Zhen J., Chen L., Xue Q.: *Toxicol. Mech. Methods* 20, 279 (2010).
17. Shegunova P., Klánová J., Holoubek I.: *Environ. Pollut. Barking Essex* 146, 257 (2007).
18. Ruprich J.: *Dietární expozice člověka [Elektronická kniha]*. Státní zdravotní ústav, Praha, 2009. Staženo 3. června 2014.
19. Palovičová V., Obernauerová M.: *Chem. Listy* 107, 936 (2013).
20. Margulis L.: *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29, 21 (1975).
21. Gray M. W.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011403 (2012).
22. Benard G., Rossignol R.: *Antioxid. Redox Signaling* 10, 1313 (2008).
23. Goldenthal M. J., Marín-García J.: *Mol. Cell. Biochem.* 262, 1 (2004).
24. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 780 (2012).
25. Sinha K., Das J., Pal P. B., Sil P. C.: *Arch. Toxicol.* 87, 1157 (2013).
26. Wallace D. C.: *Science* 283, 1482 (1999).
27. Kim J. A., Wei Y., Sowers J. R.: *Circ. Res.* 102, 401 (2008).
28. Kujoth G. C., Bradshaw P. C., Haroon S., Prolla T. A.: *PLoS Genet.* 3, e24 (2007).
29. Chan D. C.: *Cell* 125, 1241 (2006).
30. Heilbronn L. K., Gan S. K., Turner N., Campbell L. V., Chisholm D. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1467 (2007).
31. De Pauw A., Tejerina S., Raes M., Keijer R., Arnould T.: *Am. J. Pathol.* 175, 927 (2009).

32. Parish R., Petersen K. F.: *Curr. Diabetes Rep.* 5, 177 (2005).
33. Petersen K. F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D. L., DiPietro L., Cline G. W., Shulman G. I.: *Science* 300, 1140 (2003).
34. Yokono K.: *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 64, 39 (2006).
35. Gregor M. F., Hotamisligil G. S.: *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415 (2011).
36. Hotamisligil G. S.: *Nature* 444, 860 (2006).
37. Rogge M. M.: *Biol. Res. Nurs.* 10, 356 (2009).
38. Lubrano C., Genovesi G., Specchia P., Costantini D., Mariani S., Petrangeli E., Lenzi A., Gnassi L.: *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2013, 640673 (2013).
39. Covaci A., de Boer J., Ryan J. J., Voorspoels S., Schepens P.: *Environ. Res.* 88, 210 (2002).
40. Černá M., Malý M., Grabic R., Batářiiová A., Šmid J., Beneš B.: *Chemosphere* 72, 1124 (2008).
41. Smeds A., Saukko P.: *Chemosphere* 44, 1463 (2001).
42. Malarvannan G., Dirinck E., Dierckx A. C., Pereira-Fernandes A., Neels H., Jorens P. G., Gaal L. V., Blust R., Covaci A.: *Environ. Int.* 55, 33 (2013).
43. Nadal M., Domingo J. L., Garcia F., Schuhmacher M.: *Chemosphere* 74, 1471 (2009).

J. Dvořáková^a, M. Kripnerová^b, M. Čedíková^{cd}, V. Babuška^e, V. Kulda^e, M. Pešta^{bd}, M. Králíčková^{cd}, and D. Müllerová^a (^a*Department of Public Health and Preventive Medicine*, ^b*Institute of Biology*, ^c*Department of Histology and Embryology*, ^d*Biomedical Centre*, ^e*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague*): **The Influence of Persistent Organic Pollutants on Mitochondrial Functions and origin of Metabolic Syndrome**

Persistent organic pollutants are bioaccumulative and toxic to living organisms. Persistent substances may increase oxidative stress and start inflammatory processes, which are the major factors in the pathogenesis of obesity-related diseases. A clear link was found between mitochondrial dysfunction and the type 2 diabetes mellitus. A mutation in mitochondrial DNA β -cells of pancreas leads to the worsening of insulin secretion, cell apoptosis and subsequent reduction of β -cells.

PŘÍLOHA III

MÜLLEROVÁ, D., PEŠTA, M., ČEDÍKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J., KULDA, V., SRBECKÁ, K., MÜLLER, L., DVOŘÁK, P., KRIPNEROVÁ, M., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V. a J. KUNCOVÁ. DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2016 Apr 14;113-117. Dostupné z doi: 10.1016/j.jab.2016.01.002. ISSN 1214-021X.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jab>

Original Research Article

DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium



Dana Müllerová^a, Martin Pešta^{b,g}, Miroslava Čedíková^{c,g},
Jana Dvořáková^a, Vlastimil Kulda^{d,*}, Kristýna Srbecká^d,
Luděk Müller^e, Pavel Dvořák^b, Michaela Kripnerová^b,
Milena Králíčková^{f,g}, Václav Babuška^d, Jitka Kuncová^{c,g}

^a Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Lidická 4, Plzeň 301 66, Czech Republic

^b Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, alej Svobody 76, Plzeň 323 00, Czech Republic

^c Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, alej Svobody 76, Plzeň 323 00, Czech Republic

^d Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, Plzeň 301 66, Czech Republic

^e Department of Cybernetics, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Univerzitní 8, Plzeň 306 14, Czech Republic

^f Department of Histology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, Plzeň 301 66, Czech Republic

^g Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, alej Svobody 76, Plzeň 323 00, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2015

Accepted 7 January 2016

Available online 15 January 2016

Keywords:

Persistent organic pollutants

DDE

Adipocytes

Differentiation

Perilipin 2 (PLIN2)

ABSTRACT

Evidence indicating, that persistent organic pollutants are involved in the development of obesity, has emerged. The aim of this study was to reveal whether an environmental bioaccumulative human adipose tissue contaminant, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (DDE), affects adipocyte differentiation. Our study was conducted on an *in vitro* adipogenic model of human adipose derived mesenchymal stem cells (hADMSC). The adipose cultures were exposed to DDE (concentrations: 0.1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M) for 28 consecutive days, from the beginning of the experiment until full differentiation. DDE was administered in lipid vehicle (NuTRiflex). Samples for gene expression analysis by RT real-time PCR were collected on days 0, 4, 10, 21 and 28 during the course of differentiation. Differentiating adipocytes cultivated in lipid-rich medium (NuTRiflex) increased the expression of perilipin 2 (PLIN2). However, the addition of DDE suppressed this effect ($p < 0.03$). Our results may suggest that upregulation of PLIN2, caused by exposure to lipids during the differentiation of adipocytes, is reduced in the presence of DDE. This effect of DDE warrants

* Corresponding author. Tel.: +420 377 593 280.

E-mail address: Vlastimil.Kulda@lfp.cuni.cz (V. Kulda).

1214-021X/\$ – see front matter © 2016 Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia in Ceske Budejovice. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.002>

Abbreviations:DDE, *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethyleneDDT, *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane

POPs, persistent organic pollutants

LDs, lipid droplets

TG, triglyceride

PLIN2, perilipin 2

PKA, protein kinase A

future attention, because of the important role of PLIN2 in formation and stabilization of lipid droplets, as the impairment of their function could be linked to the worldwide obesity epidemic.

© 2016 Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia in Ceske Budejovice. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Introduction

Many organochlorine compounds have been used worldwide as agricultural pesticides. Among those widely used was 1,1'-(2,2,2-trichloroethane-1,1-diyl)bis(4-chlorobenzene) (DDT) and although DDT has not been used in the developed countries since the 1970s, it is still present in the environment. DDE's chemical stability and extreme lipophilicity predispose it to exhibiting bioaccumulative properties similar to other persistent organic pollutants (POPs) with high affinity to adipose tissue, which represents their long-term reservoir. The presence of DDT, and perhaps more importantly that of its metabolic product 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethylene (DDE), is still detected in the food chain today (Maršálek et al., 2013). So it is by no means surprising to find POPs present in human tissues (Hardell et al., 2010; Waliszewski et al., 2012).

Recently, epidemiological studies have revealed that elevated serum concentrations of certain POPs, including DDE, correlate positively with increased type 2 diabetes prevalence in humans (Taylor et al., 2013). DDE's influence has been confirmed to be both diabetogenic and obesogenic (Dirinck et al., 2014). Studies of subacute exposure to DDE on mice models have demonstrated that DDE causes significant hyperglycaemia (Howell et al., 2014). The effect of chronic exposure to DDE in conjunction with a high fat diet was found to be biphasic; after initial promotion of fasting hyperglycaemia, glucose levels decreased and by week 13 animals chronically exposed to DDE were normoglycemic (Howell et al., 2015). Alongside their part in lipid metabolism, adipocytes may facilitate cancer progression by playing an important role in the tumor microenvironment (Omabe et al., 2015).

The specific mechanism of POPs' action is not yet known. POPs are almost exclusively stored within the lipid droplets (LDs) of adipocytes and they depend on triglyceride (TG) content (Bourez et al., 2012; Hong et al., 2012). LDs' size in adipocytes reflects the degree of their differentiation and the intensity of intracellular metabolic processes. The TG core of LDs is surrounded by phospholipids and a variety of proteins (Tauchi-Sato et al., 2002). One such protein is perilipin 2 (PLIN2), formerly known as adipose differentiation-related protein (ADRP). PLIN2 has long been recognized as a universal marker for intracellular LD in tissues, but its function is just

beginning to be elucidated. It has been discovered one of PLIN2's domains is involved in LD stabilization and lipid accumulation (Sentinelli et al., 2015). These findings are supported by the fact, that upregulation of PLIN2 is associated with TG storage in LDs. As adipocytes mature, they gain neutral lipids and PLIN2 is replaced by PLIN1 (Wolins et al., 2003, 2005).

In order to verify the hypothesis that DDE may influence adipocyte differentiation and metabolism, adipocytes, during their differentiation from human adipose derived mesenchymal stem cells (hADMSC), were exposed to DDE. Our study is the first to demonstrate that upregulation of PLIN2, caused by lipids during differentiation of hADMSC, was reduced by DDE.

Materials and methods**Cell culture and differentiation**

For adipogenic differentiation, hADMSCs (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) were seeded with a total number of 1×10^5 cells in a 6-well cell culture plate (TPP Techno Plastic Products, Switzerland), and cultured in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C according to the manufacturer's instructions in StemPro[®] Adipogenesis Differentiation medium supplemented with 1% Gentamicin.

Cell DDE treatment

The cultures were exposed to DDE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 28 consecutive days from the start of the experiment until full differentiation was achieved (DDE concentrations: 0.1 μM, 1 μM, and 10 μM). The concentrations of DDE were chosen to reflect the levels measured in humans (Dirinck et al., 2014). DDE was administered in the lipid fraction of NuTRiflex[®] Lipid peri (B. Braun, Melsungen, Germany), present in 0.2% (v/v) concentration (0.2 ml of vehicle per 100 ml of medium), containing medium chain triglycerides (0.1 g/l) and soya bean oil (0.1 g/l). Control cultures received the differentiation medium alone or with vehicle without DDE. The samples for quantitative estimation of mRNA were taken on days 0, 4, 10, 21 and 28. Fig. 1 shows the cell cultivation design used in the pilot trial and in the subsequent triplicate experiment.

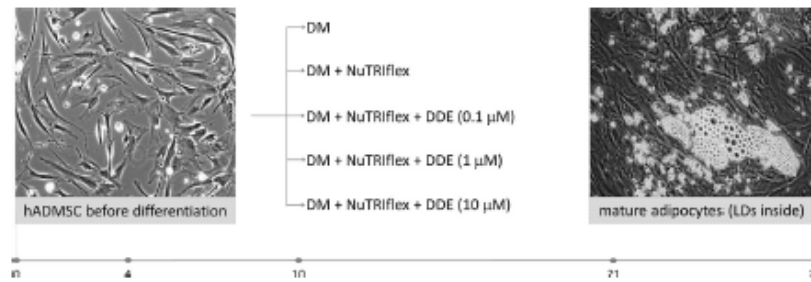


Fig. 1 – Cell cultures were divided into five sets: a set containing only DM; a set with DM supplemented with vehicle (NuTRiflex) without DDE; and three sets containing DM and different concentrations of DDE (0.1 μM, 1 μM and 10 μM) administered in vehicle. Round dots on the timeline indicate the days on which samples were taken. Abbreviations: DM, differentiation medium; DDE, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylen; hADMSC, human adipose derived mesenchymal stem cells; LDs, lipid droplets.

Table 1 – Sequences of primers and corresponding UPL probes.

Symbol	Gene name	Function	Primer sequence 5'–3'	UPL probe
PLIN2	Perilipin 2, ADRP	Surface protein of intracellular lipid droplets	TCAGCTCCATTCTACTGTTCACC CCTGAATTTTCTGATTGGCACT	72
<i>Reference genes</i>				
GUSB	β-Glucuronidase	Lysosomal breakdown of glycosaminoglycans	CGCCCTGCTATCTGTATTC TCCOCACAGGGAGTGTGTAG	57
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	Purine salvage pathway	TGACCTTGATTTATTTGCATACC CGAGCAAGAAGTTCAGTCCT	73
YWHAZ	14-3-3 protein zeta	Signal transduction regulating adaptor	GCAATTACTGAGAGACAACCTTGACA TGGAAGGCCGGTTAATTTT	2

Quantitative estimation of mRNA using RT real-time PCR

Quantitative estimation of the mRNA of PLIN2 was performed by a RT real-time PCR method with UPL probes (Universal Probe Library, Roche). Total RNA was isolated from a pellet of cells (approximately 10⁵ cells) by FastRNAPro Green Kit (QBIogene, Irvine, CA, USA). Reverse transcription (RT) was performed from 250 ng of total RNA with Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using random hexamers as primers. The sequences of primers and corresponding UPL probes were generated by ProbeFinder Software (Roche, Mannheim, Germany) and are listed in Table 1.

A quantitative estimation was performed in technical duplicates on Stratagene Mx3005P apparatus (Agilent Technologies, Inc). All samples were also assessed for the expression of reference genes β-glucuronidase (GUSB), hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ). The results are presented as normalized values (2^{-ΔΔCt} algorithm) using the geometric mean of quantifications (Ct) of three reference genes (Kozera and Rapacz, 2013).

Statistical analysis

Non-parametric Wilcoxon two-sided signed-rank test was performed for statistical analysis. The data is presented as

mean ± standard error of mean. The results were considered statistically significant at the significance level α = 0.05.

Results

Differentiating adipocytes cultivated in lipid-rich medium (NuTRiflex) showed a statistically significant increase of PLIN2 expression in comparison with adipocytes cultivated in differentiation medium only. However, DDE appeared to diminish the effect of NuTRiflex on PLIN2. Statistically significant downregulation of PLIN2 was recorded in cell cultures containing DDE at a concentration of 0.1 μM and 1 μM (using data from day 10 and day 21 together). Analysis of the change of expression of PLIN2 in cells exposed to DDE at a concentration of 10 μM was statistically inconclusive. The presented results are summarized in Fig. 2.

Discussion

To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate that upregulation of PLIN2, caused by lipids during differentiation of hADMSC, was reduced by DDE. Although PLIN2's cellular function is not fully understood, it seems to be indispensable for intracellular lipid storage in a variety of cells. While PLIN2 upregulation in myocytes

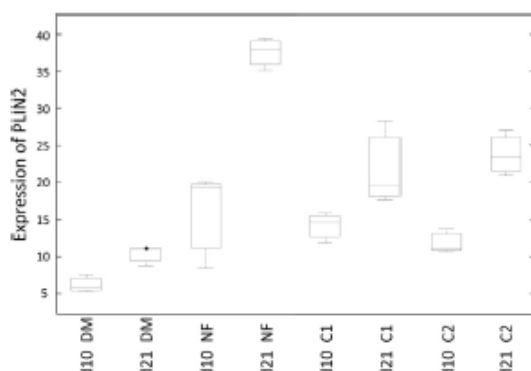


Fig. 2 – PLIN2 expression of differentiating cells cultivated in DM, DM and NuTRiflex, and DM, NuTRiflex and DDE (0.1 μ M, 1 μ M). Statistical analysis was conducted using the Wilcoxon two-sided signed-rank test using data from day 10 and day 21 together. Comparison between DM alone and DM with NuTRiflex was statistically significant as well as between DM with NuTRiflex and DM with DDE diluted in NuTRiflex at concentrations 0.1 μ M and 1 μ M. Abbreviations: d10, day 10; d21, day 21; DM, differentiation medium; PLIN2, perilipin 2; NF, differentiation medium supplemented with NuTRiflex; C1, differentiation medium supplemented with NuTRiflex and DDE at concentration 1 μ M; C2 differentiation medium supplemented with NuTRiflex and DDE at concentration 0.1 μ M.

improves insulin resistance (Timmers et al., 2011), its over-expression in hepatocytes or endothelial cells leads to hepatic steatosis and the formation of foam plaques (Magnusson et al., 2006). It is suggested that PLIN2 plays an important role in the maturation of adipocytes (Storey et al., 2011). The molecular mechanism by which DDE changes PLIN2 expression has not been described yet. We suppose that the mechanism of DDE's effect could be mediated by the protein kinase A (PKA) signaling pathway. There is evidence that DDE decreases cAMP synthesis in stable pig granulosa cell lines (Crellin et al., 2001). The second messenger's, cAMP's, effect is mediated by PKA (Meinkoth et al., 1993). Liver X receptor (LXR) is one of the known target proteins phosphorylated by PKA (Yamamoto et al., 2007). Kotokorpi et al. have shown that the human PLIN2 gene is a direct LXR target gene and that different LXR agonists regulate the endogenous gene (Kotokorpi et al., 2010).

Furthermore, it has been confirmed that PLIN2 contains progesterone receptor binding sites (Yin et al., 2012). Progesterone partial agonist/antagonist RU486 upregulated PLIN2 expression in a dose- and time-dependent manner in breast cancer and uterine leiomyoma cells. Positive association between progesterone and PLIN2 levels was observed in endometrium during conceptus elongation as well (Forde et al., 2013). Therefore we suppose another way of affecting the expression of PLIN2 by DDE may be via the progesterone signaling pathway.

The results of our study suggest PLIN2 is downregulated by DDE during the differentiation of adipocytes exposed to lipids.

PLIN2 has an important role in the formation and stabilization of LDs, whose metabolism could be influenced by DDE in this way. This process warrants future attention, especially when the crucial role of LDs in energy homeostasis is considered, as the impairment of their function could be linked to the worldwide obesity epidemic and diabetes mellitus type 2. Better understanding the pathophysiological effects of the environmental pollutant DDE may help in the prevention of these diseases.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by the grant of Ministry of Health of the Czech republic NT14330-3/2013 Polychlorinated persistent organic pollutants in the etiopathogenesis of obesity and insulin resistance.

REFERENCES

- Bourez, S., Le Lay, S., Van den Daelen, C., Louis, C., Larondelle, Y., Thomé, J.-P., Schneider, Y.-J., Dugail, I., Debier, C., 2012. Accumulation of polychlorinated biphenyls in adipocytes: selective targeting to lipid droplets and role of caveolin-1. *PLoS ONE* 7, e31834.
- Crellin, N.K., Kang, H.G., Swan, C.L., Chedrese, P.J., 2001. Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyldichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line. *Reprod. Camb. Engl.* 121, 485–492.
- Dirinck, E.L., Dirtu, A.C., Govindan, M., Covaci, A., Van Gaal, L.F., Jorens, P.G., 2014. Exposure to persistent organic pollutants: relationship with abnormal glucose metabolism and visceral adiposity. *Diabetes Care* 37, 1951–1958.
- Forde, N., Mehta, J.P., McGettigan, P.A., Mamo, S., Bazer, F.W., Spencer, T.E., Lonergan, P., 2013. Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle. *BMC Genomics* 14, 321.
- Hardell, E., Carlberg, M., Nordström, M., van Bavel, B., 2010. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993–2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci. Total Environ.* 408, 4412–4419.
- Hong, N.-S., Kim, K.-S., Lee, I.-K., Lind, P.M., Lind, L., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., 2012. The association between obesity and mortality in the elderly differs by serum concentrations of persistent organic pollutants: a possible explanation for the obesity paradox. *Int. J. Obes.* 36, 1170–1175.
- Howell, G.E., Meek, E., Kilic, J., Mohns, M., Mulligan, C., Chambers, J.E., 2014. Exposure to p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) induces fasting hyperglycemia without insulin resistance in male C57BL/6H mice. *Toxicology* 320, 6–14.
- Howell, G.E., Mulligan, C., Meek, E., Chambers, J.E., 2015. Effect of chronic p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. *Toxicology* 328, 112–122.

- Kotokorpi, P., Venteclef, N., Ellis, E., Gustafsson, J.-A., Mode, A., 2010. The human ADFFP gene is a direct liver-X-receptor (LXR) target gene and differentially regulated by synthetic LXR ligands. *Mol. Pharmacol.* 77, 79–86. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.059063>.
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391–406.
- Magnusson, B., Asp, L., Boström, P., Ruiz, M., Stillemark-Billton, P., Lindén, D., Borén, J., Olofsson, S.-O., 2006. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1566–1571.
- Maršálek, P., Zelníčková, L., Mikuláštková, J., Svobodová, Z., Hutařová, Z., 2013. Organochlorine compound residues in muscle of wild boar (*Sus scrofa* L.) and red deer (*Cervus elaphus* L.): effects of age and sex. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 673–677.
- Meinkoth, J.L., Alberts, A.S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S.S., Hagiwara, M., Montminy, M., Feramisco, J.R., 1993. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biochem.* 127–128, 179–186.
- Omabe, M., Ezeani, M., Omabe, K.N., 2015. Lipid metabolism and cancer progression: the missing target in metastatic cancer treatment. *J. Appl. Biomed.* 13, 47–59.
- Sentinelii, F., Capocci, D., Incani, M., Bertocchini, L., Severino, A., Pani, M.G., Manconi, E., Cossu, E., Leonetti, F., Baroni, M.G., 2015. The Perilipin 2 (PLIN2) gene Ser251Pro missense mutation is associated with reduced insulin secretion and increased insulin sensitivity in Italian obese subjects: PLIN2 Ser251Pro Mutation and Insulin Secretion. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2751>.
- Storey, S.M., McIntosh, A.L., Senthivayagam, S., Moon, K.C., Atshaves, B.P., 2011. The phospholipid monolayer associated with perilipin-enriched lipid droplets is a highly organized rigid membrane structure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E991–E1003.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T., 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* 277, 44507–44512.
- Taylor, K.W., Novak, R.F., Anderson, H.A., Birnbaum, L.S., Blystone, C., DeVito, M., Jacobs, D., Köhrle, J., Lee, D.-H., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Tornero-Velez, R., Turyk, M.E., Boyles, A.L., Thayer, K.A., Lind, L., 2013. Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environ. Health Perspect.* 121, 774–783.
- Timmers, S., de Vogel-van den Bosch, J., Hesselink, M.K.C., van Beurden, D., Schaart, G., Ferraz, M.J., Losen, M., Martinez-Martinez, P., De Baets, M.H., Aerts, J.M.F.G., Schrauwen, P., 2011. Paradoxical increase in TAG and DAG content parallel the insulin sensitizing effect of unilateral DGAT1 overexpression in rat skeletal muscle. *PLoS ONE* 6, e14503.
- Waliszewski, S.M., Caba, M., Rodríguez Díaz, S.S., Saldamiaga-Noreña, H., Meza, E., Zepeda, R., Infanzón, R., 2012. Levels of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Tabasco, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 1062–1067.
- Wolins, N.E., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bensch, K.G., Bickel, P.E., 2003. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 278, 37713–37721.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bickel, P.E., 2005. S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 19146–19155.
- Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., Yamada, N., 2007. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J. Biol. Chem.* 282, 11687–11695.
- Yin, P., Roqueiro, D., Huang, L., Owen, J.K., Xie, A., Navarro, A., Monsivais, D., Coon V, J.S., Kim, J.J., Dai, Y., Bulun, S.E., 2012. Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. *PLoS ONE* 7, e29021.

PŘÍLOHA IV

ČEDÍKOVÁ, M., KRIPNEROVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J., PITULE, P.,
GRUNDMANOVÁ, M., BABUŠKA, V., MÜLLEROVÁ, D. a J. KUNCOVÁ.
Mitochondria in White, Brown and Beige Adipocytes. *Stem Cells International* [online].
2016;2016:6067349. doi: 10.1155/2016/6067349. PMID: 16791199.

Review Article

Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes

Miroslava Cedikova,^{1,2} Michaela Kripnerová,³ Jana Dvorakova,⁴ Pavel Pitule,^{2,5}
Martina Grundmanova,^{1,2} Vaclav Babuska,⁶ Dana Mullerova,⁴ and Jitka Kuncova^{1,2}

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

²Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

³Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁴Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁶Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jitka Kuncova; jitka.kuncova@lfp.cuni.cz

Received 31 July 2015; Revised 17 January 2016; Accepted 28 January 2016

Academic Editor: Norbert Pallua

Copyright © 2016 Miroslava Cedikova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mitochondria play a key role in energy metabolism in many tissues, including cardiac and skeletal muscle, brain, liver, and adipose tissue. Three types of adipose depots can be identified in mammals, commonly classified according to their colour appearance: the white (WAT), the brown (BAT), and the beige/brite/brown-like (bAT) adipose tissues. WAT is mainly involved in the storage and mobilization of energy and BAT is predominantly responsible for nonshivering thermogenesis. Recent data suggest that adipocyte mitochondria might play an important role in the development of obesity through defects in mitochondrial lipogenesis and lipolysis, regulation of adipocyte differentiation, apoptosis, production of oxygen radicals, efficiency of oxidative phosphorylation, and regulation of conversion of white adipocytes into brown-like adipocytes. This review summarizes the main characteristics of each adipose tissue subtype and describes morphological and functional modifications focusing on mitochondria and their activity in healthy and unhealthy adipocytes.

1. Introduction

Over the past few decades, the number of studies in the field of adipose tissue biology has increased exponentially since obesity and associated diseases are occurring at epidemic rates not only in developed countries, but also in developing countries. Obesity arises from an imbalance between energy intake and expenditure. It is associated with an increased risk of type 2 diabetes, hypertension, atherosclerosis, heart disease, stroke, cancer, infertility, and so forth [1–5]. Current clinical approaches to obesity include diet, physical activity, psychological support, drugs, and surgery treatment. Unfortunately, these treatment methods show efficiency limited only to small percentage of patients and some of them may be accompanied by serious side effects.

Studies published over the last two decades have established adipose tissue as a dynamic organ that carries out several important physiological processes. It is composed of a number of cell types: adipocytes, preadipocytes, vascular endothelial cells, pericytes, macrophages, and fibroblasts [6]. However, the dominant cells present in adipose tissue are mature adipocytes.

Two major types of adipose tissue exist in mammals, brown and white fat that have essentially antagonistic functions, brown fat expending energy and white fat storing it [7]. Brown adipocytes may occur after thermogenic stimulation at anatomical sites corresponding to WAT. This process is called the “browning” of WAT and these brown-like adipocytes that appear in WAT are called “beige” or “brite” [8, 9]. These three types of adipose cells have many specific

characteristics related to localization, cell composition (lipid droplet, mitochondria), function, pathways of homeostatic control, obesity related changes, and so forth [8, 10].

Recent data suggest that adipocyte mitochondria might play an important role in the development of obesity through defects in mitochondrial lipogenesis and lipolysis, regulation of adipocyte differentiation, apoptosis, production of oxygen radicals, efficiency of oxidative phosphorylation, and regulation of conversion of white adipocytes into brown-like adipocytes [11, 12]. Thus, therapeutic intervention into any of these mitochondrial processes could be a useful approach to reduce adiposity [13].

This review summarizes the main characteristics of each adipose tissue subtype and describes morphological and functional modifications focusing on mitochondria and their activity in healthy and unhealthy adipocytes.

2. Overview of Mitochondrial Functions

Mitochondria are the cytoplasmic organelles in human and animal cells where many distinct metabolic pathways take place [14]. Mitochondria are highly dynamic, pleomorphic organelles comprising at least six compartments: outer membrane, inner boundary membrane of significantly larger surface area, intermembrane space, cristal membranes, intracristal space, and protein rich matrix. They are found in almost all human cells except mature erythrocytes [15, 16]. Although mitochondria contain their own small mtDNA and some RNA components of mitochondrial translational apparatus, the vast majority of the mitochondrial proteins are encoded by nuclear DNA, synthesized in the cytosol, and then imported into the mitochondria posttranscriptionally [15]. Mitochondria are involved in the crucial metabolic processes including tricarboxylic acid cycle, pyruvate decarboxylation, oxidative decarboxylation of fatty acids (β -oxidation), and degradation of branched amino acids. Mitochondria also substantially contribute to biosynthetic processes taking place in the cytosol by providing key intermediates like urea cycle, fatty acids, and heme synthesis. However, the principal role of mitochondria is to synthesize more than 95% of adenosine triphosphate (ATP) for cellular utilization [14, 16]. Production of ATP requires two major steps, oxidation of highly reducing metabolites and coenzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH_2) and phosphorylation of adenosine diphosphate to generate ATP to support various cellular functions (OXPHOS, oxidative phosphorylation) [17]. The mitochondrial respiratory system consists of four enzymatic multiheteromeric complexes (I–IV) embedded in the inner membrane of mitochondria and two individual mobile molecules, coenzyme Q (CoQ) and cytochrome *c*, along which the electrons liberated by the oxidation of NADH and FADH_2 are passed and ultimately transferred to molecular oxygen. This respiratory process creates the electrochemical gradient of protons and membrane potential about 180 mV across the inner membrane that has the potential to do work. The proton flux drives the F_0F_1 ATP synthase (complex V) to phosphorylate matrix ADP by inorganic phosphate [18, 19]. On the other hand, mitochondria

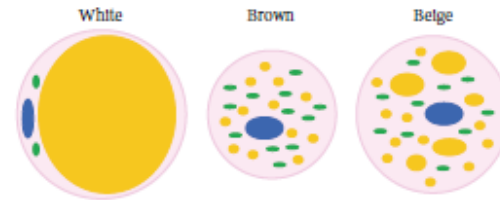


FIGURE 1: Main morphological characteristics of white, brown, and beige adipose tissues. White adipocyte cell is classically spherical, it is full of single lipid droplet, and it contains few mitochondria. Brown adipocyte is usually smaller than white and beige ones. It contains a large number of mitochondria and contains multiple small lipid droplets. Blue: nucleus, green: mitochondria, and yellow: lipid droplets.

generate heat by a mechanism called "proton leak." Protons leak from the intermembrane space to matrix and reduce membrane potential generating heat instead of energy [17]. Mitochondria are also deeply involved in the production of reactive oxygen species (ROS) through electron carriers in the respiratory chain. Oxidative stress can induce apoptotic death and mitochondria have a central role in this process due to cytochrome *c* release in the cytoplasm and opening of the permeability transition pore [20, 21]. Mitochondria are essential for the maintenance of normal physiological function of tissue cells and mitochondrial dysfunction may cause pathological changes in the human body [14]. In addition, eukaryotic cells have the ability to initiate adaptive responses to different environmental stimuli (e.g., cell growth, death and differentiation, or modification in energy demands) by altering the number, morphology, or remodelling of mitochondria [11].

3. White versus Brown versus Beige Adipocyte Tissue

In mammals, we can find three types of adipose depots commonly classified according to their colour appearance: the white (WAT), the brown (BAT), and the beige/brite/brown-like (bAT) adipose tissues. Main characteristics of WAT, BAT, and bAT in humans are shown in Table 1 and main morphological differences are shown in Figure 1. Most mammals have WAT dispersed throughout the body in two major types of depots, subcutaneous and intra-abdominal (or visceral). Intra-abdominal fat includes retroperitoneal, omental, mesenteric, epicardial, and gonadal deposits. WAT weight generally represents as much as 20% of the body weight of normal adult human and primarily acts as a storage site for triglycerides, conserving excess calories for use in times of scarcity. White adipocytes contribute to the whole body insulation and have endocrine functions including secretion of leptin, $\text{TNF-}\alpha$, adiponectin, resistin, and other compounds related to the degree of obesity and insulin sensitivity [22].

Humans have relatively large depots of BAT in infancy; only small amounts of BAT dispersed throughout the depots

TABLE 1: Main differences amongst the three types of adipocyte tissue.

Characteristic property	White	Brown	Beige	References
Morphology				
(i) Shape	Spherical	Ellipsoid/polygonal	Spherical	
(ii) Cell size	Variable, large (25–200 μm)	Small (15–60 μm)	Variable, smaller than white	[8, 9, 23]
(iii) Lipid droplet (LD)	Single large LD	Multiple small LD	Multiple LD with variable size	
(iv) Mitochondria	+	+++	++ (upon stimulation)	
Development	From Myf5 ⁻ or Myf5 ⁺ precursors	From Myf5 ⁺ precursors	From Myf5 ⁻ or Myf5 ⁺ precursors	[23–26]
Location	Subcutaneous and visceral	Suprarenal, paravertebral, supraclavicular	Inguinal, neck (near carotid sheath and musculus longus colli), other locations?	[8, 27]
Function	Energy storage	Heat production	Adaptive thermogenesis	[9]
Uncoupling protein	Nearly undetectable	+++	++ (upon stimulation)	[28, 29]
Adipocyte-type-specific markers	PPAR γ , PLIN1, HOXC9, TCF21, TLE3, C/EBP α , Rb, Rip140	LHX8, ZIC1, EPST11, PRDM16, CIDEA, ELOVL3	HOXC8, HOXC9, CITED1, CD137, TMEM26, TBX1, CD40	[13, 23, 30, 31]
Vascularization	Low	High	High upon stimulation	[32, 33]
Impact on obesity	Positive	Negative	Negative	[34]
Correlation with insulin resistance	Yes	Probably yes	Probably yes	[35–38]

CD40: CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5; CD137: tumour necrosis factor receptor superfamily, member 9; C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha; CIDEA: cell death-inducing DFFA-like effector; CITED1: Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1; ELOVL3: ELOVL fatty acid elongase 3; EPST11: epithelial stromal interaction 1; HOXC8: homeobox C8; HOXC9: homeobox C9; LHX8: LIM homeobox protein 8; PLIN1: perilipin-1; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PRDM16: PR domain containing 16; Rb (Rb1): retinoblastoma 1; Rip140: nuclear receptor interacting protein 1; TBX1: T-Box 1; TCF21: transcription factor 21; TLE3: transductin-like enhancer of split 3; TMEM26: transmembrane protein 26; ZIC1: zinc finger protein of the cerebellum 1.

of WAT persist in adults. Classical brown fat is primarily distributed in the interscapular space, paravertebrally, axillary, and perirenally. Recent studies have confirmed the presence of active BAT containing both classical brown and beige adipocytes in adult humans, with depots residing in the cervical, supraclavicular, mediastinal, paravertebral, and suprarenal regions [27, 39, 40].

White adipocyte cell is classically spherical and large with flattened nucleus, which is situated in the periphery. Because it is nearly completely filled with a single lipid droplet, thin ring of cytoplasm contains few mitochondria and little but recognizable smooth endoplasmic reticulum [41]. Brown adipocyte is usually smaller than the white one and its shape is elliptical with round or oval nucleus situated centrally. Cytoplasm volume is large containing multiple small lipid droplets, poor endoplasmic reticulum, and high amount of mitochondria.

Beige adipocyte has the mixed characteristics of both white and brown adipose cells. During basal state, it displays unilocular morphology as white adipocyte, but, upon cold stimulation, its appearance acquires features of intermediate morphology ultimately resulting in expression of proteins typical for BAT and transformation of stored fat into the small lipid droplets typical for brown adipocytes [8, 42, 43]. The origin and function of beige adipocytes are less clear and currently under intense discussion. It is thought that they arise from unique precursor cells [42], but there is also evidence that they stem from white adipocytes by

transdifferentiation of preexisting white adipocytes. Himms-Hagen et al. treated rats with β 3-adrenoceptor agonist (CL-316243); the results of their study showed that at least a subpopulation of unilocular adipocytes underwent conversion to multilocular mitochondria-rich adipocytes [44]. Interestingly, Morroni and coworkers suggested a new mechanism of reversible physiological transdifferentiation of adipocytes in the mammary gland: mouse mammary adipocytes are able to transform into secretory epithelial cells during pregnancy and revert to adipocytes after lactation [45]. Moreover, recent research has shown novel mechanism of the bAT formation. Wang et al. suggested that during cold-induced “browning” of subcutaneous fat, most “beige” adipose cells stem from *de novo* differentiated adipocytes [46]. Vargas et al. found that adipocytes differentiated with total and partial agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and exposed to 31°C are able to respond to cold by a significant increase in the expression of thermogenic proteins such as uncoupling protein 1 (UCP1), peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator 1 (PGC1 α), and Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1 (CITED1), a marker of the beige phenotype [28]. Two potential models of mature WAT into bAT transformation are shown in Figure 2.

Interestingly, exercise has been recently considered as a physiological stimulus for brown adipose tissue activity [47]. Even vibration training changed lipid metabolism in rats and promoted brown fat-like modifications in white adipose

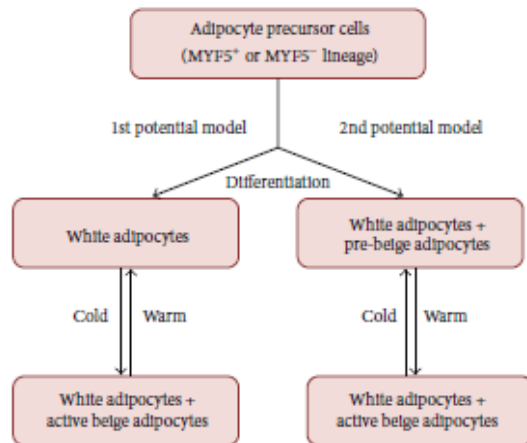


FIGURE 2: Two potential models of how WAT can be transformed into beige adipocytes [23, 25, 26].

tissues through triggering BAT-associated gene expression, inflammatory response, and decrease in energy reserve [48]. Understanding these biological processes and stimulation of the activity of brown and beige/brite adipocytes could help us with fight against obesity, potentially facilitate weight loss, and improve metabolic health [49].

4. Mitochondrial Activity in Adipocytes

Mitochondria play a central role in metabolism of adipose tissue, as documented by their contribution to metabolic pathways of particular importance in adipocytes, like lipolysis and lipogenesis [11]. In addition, specific function performed by brown fat is converting mitochondrial energy into heat in adaptive thermogenesis. Tissue-specific functions of mitochondria in white fat are less characterized [50], although their role in orchestrating metabolic homeostasis and weight control is now widely accepted [51].

Lipolysis in adipocytes is the hydrolysis of triglycerides from lipid droplets within the cell into glycerol and free fatty acids by hormone-sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL). The hydrolytic action of HSL is regulated by perilipin A, a lipid droplet-associated protein. Phosphorylation of perilipin A by cAMP-dependent protein kinase (PKA) facilitates the translocation of HSL into the lipid droplet [52]. In the cytoplasm, free fatty acids are presumably bound to binding proteins and subsequently moved across the inner mitochondrial membrane by diffusion or, in the case of long carbon chains, by the carnitine shuttle [39, 53]. β -oxidation, metabolic process breaking down free fatty acids into acetyl-CoA takes place in the mitochondrial matrix. Acetyl-CoA then undergoes oxidation through the tricarboxylic acid cycle and the electron transport system.

The lipogenesis *de novo* is an important pathway to convert fatty acids to triglycerides for storage in the WAT. The human liver is mainly responsible for the conversion of

carbohydrates into fatty acids, but a small part of triglycerides is synthesized in adipocytes [52]. Although fatty acids and triglycerides synthesis take place in the cytosol, mitochondria provide key intermediates needed for lipogenesis, like glycerol 3-phosphate and acetyl-CoA. Key enzyme in glycerol 3-phosphate synthesis is mitochondrial pyruvate carboxylase that converts pyruvate into oxaloacetate. Pyruvate also undergoes decarboxylation to acetyl-CoA by the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex, which facilitates fatty acid and triglyceride synthesis [54].

As mentioned above, brown/beige adipocytes, when activated by sympathetic stimulation, dissipate chemical energy stored in the form of triglycerides by channelling fatty acids into β -oxidation. Energy of substrate oxidation is then converted into heat [49, 55, 56]. This process, termed nonshivering thermogenesis, is specific function of BAT/bAT and is particularly important during hibernation and for small animals and infants who have greater demands on thermogenesis due to a large surface-to-volume ratio [57]. The molecular substrate of this unique function is a protein containing three similar repeats of about 100 amino acids coded by nuclear genes and inserted into the inner mitochondrial membrane [58]. As the major role of the protein is proton translocation resulting in uncoupling of the electron-transporting system from ATP synthesis in the mitochondria, it was named uncoupling protein (UCP) [59].

Uncoupling proteins belong to a family of mitochondrial carrier proteins that are present in the mitochondrial inner membrane. Mammals express five UCP homologues (UCP1 also named thermogenin), UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5, also known as brain mitochondrial carrier protein 1 (BMCP1) [60]. UCP1 is expressed almost exclusively in fully differentiated BAT cells [17], although some findings suggest that UCP1 can be detected also in other tissues including uterine smooth muscle and even WAT, where induction of uncoupling protein expression is associated with acquiring of brown fat features [61, 62]. Expression of UCP1 in WAT has been questioned by finding of brown adipocytes in white depots and white adipocytes that potentially could transdifferentiate into cells expressing markers of BAT/bAT after appropriate stimulation [56, 62]. UCP2 and UCP3 mRNAs have been detected in a number of tissues and organs, for example, thymus, stomach, testis, white and brown adipocytes, pancreatic β -cells (UCP2) and skeletal muscle, heart, and brown adipocytes (UCP3) [63–67]. The physiological function of UCP1 is to mediate a regulated proton leak and thus dissipate the proton electrochemical gradient built up by the respiratory chain in the form of heat. Maximally stimulated brown adipose tissue can produce about 300 W/kg of heat compared to 1 W/kg in all other tissues [29, 68]. The thermogenesis in BAT is induced and positively regulated by fatty acids; in fact, no heat generation can be elicited without simultaneously initiating lipolysis. Further oxidation of acetyl-CoA the end product of β -oxidation, through tricarboxylic acid cycle and the electron transport chain, provides energy dissipated as heat through the action of UCP1 [69]. In contrast to UCP1, physiological function of its homologues is still debated. Recent studies

have shown that UCPs might have an important role in pathogenesis of various disorders as type 2 diabetes, obesity, heart failure, neurodegenerative diseases, aging, or tumorigenesis [70–75].

Metabolic differences between mitochondria of WAT and BAT are associated with specific morphological characteristics of mitochondria in the brown adipocytes. These mitochondria are apparently more numerous and bigger in size and contain more cristae than mitochondria in white adipocytes. In addition, content of the heme cofactors in the mitochondrial enzyme cytochrome oxidase gives the tissue the brown macroscopic colour [16, 76]. Compared to BAT, WAT has fewer mitochondria, mostly undetectable expression of UCP1, and lower expression levels of the fatty acid β -oxidation-related enzyme, acyl CoA dehydrogenase, suggesting that the intensity of β -oxidation in WAT is lower than in BAT [53, 56, 77, 78]. As in other tissues, mitochondria represent the main source of ATP in the white fat. White fat mitochondria are well equipped for oxidative phosphorylation, with pyruvate serving as a main source of energy for ATP synthesis. Due to low activity of carnitine palmitoyltransferase 1 in the inner mitochondrial membrane, oxidation of fatty acids is relatively slow and fatty acids are directed towards esterification, unless the transferase is activated by leptin [79].

Forner et al. reported a systematic analysis of mouse mitochondrial proteomes of brown and white adipocytes documenting significant differences in the two sets of proteins, both qualitative and quantitative. Acetyl-CoA synthetase 2-like (gene *Acssf*), converting acetate to acetyl-CoA, and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (gene *Pdk4*), inhibiting the pyruvate dehydrogenase complex thereby reducing the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, were detected only in BAT. Conversely, MOSC domain-containing protein 1 (gene *Mosc1*), component of prodrug-converting complex, and acyl-coenzyme A synthetase ACSM5 (gene *Acsm5*), having CoA ligase activity, were detected only in WAT [50]. At transcript and proteome levels, BAT mitochondria were more similar to their counterparts in muscle cells. In contrast, WAT mitochondria not only selectively expressed proteins that support anabolic lipogenic function but also degrade xenobiotics and endogenous molecules, revealing a protective role of this tissue. These observations might help in better understanding of physiological processes in adipose tissue [50].

During adipocyte differentiation, the appropriate function of mitochondrion-specific metabolic processes is essential [11]. Adipogenic differentiation is characterized by the enhanced expression of some critical transcriptional factors, for example, *C/EBP α* and *PPAR γ* [80, 81], lipid droplet accumulation, mitochondrial biogenesis [82], and a 20- to 30-fold increase in the concentration of numerous mitochondrial proteins [83]. ATP needed for the mitochondrial biogenesis, lipogenesis, and synthesis of numerous cytosolic and mitochondrial proteins is generated in the increased amounts due to the enhanced synthesis of mitochondrial DNA, subunits of respiratory complexes, cytochrome c, and enzymes of the tricarboxylic acid cycle [84]. In addition, tricarboxylic acid cycle generates citrate, which is then transported from

the mitochondrion into the cytosol via the tricarboxylate carrier. Citrate is the only precursor of cytosolic acetyl-CoA, key intermediate used for fatty acid synthesis. Thus, citrate export from the mitochondria is essential during early differentiation stages of preadipocytes [85].

It has been also reported that a new adipose-specific protein, mouse ISG12b1, which is localized in the mitochondria, is predominantly overexpressed in adipocytes and dramatically induced at the terminal stage of adipogenesis. Functionally, ISG12b1 inhibits mitochondria biogenesis and adipocyte differentiation [86].

Taken together, although mitochondria in the brown fat are mainly acknowledged as important regulators of thermogenesis and those in the white fat as providers of constituents essential for lipogenesis, recent evidence suggests that mitochondria in adipose tissues might play plentiful roles in the regulation of the whole body energy homeostasis, crosstalk between adipose tissues and striated muscle, or control of insulin sensitivity and glucose metabolism [87–90].

5. Mitochondrial Dysfunction in Adipocyte

Mitochondrial dysfunction can result from a decrease in mitochondrial biogenesis, reduced mitochondrial content, and/or a decrease in the protein content and activity of oxidative proteins “per unit of mitochondria” [91]. The major tissues affected by mitochondrial dysfunction are those with a high energy demand such as heart, muscles, brain, and endocrine glands [11, 92]. However, in the past few years, many studies have targeted mitochondria in adipocytes or adipose tissues providing convincing evidence that impairment of mitochondrial functions in adipocytes could have the whole body pathological consequences [12, 51]. As mitochondria house crucial metabolic processes like fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation, and ROS production, it is not surprising that impaired mitochondrial activity often has an association with metabolism and adipocyte differentiation [92].

5.1. Mitochondrial Dysfunctions in Metabolic Disorders. As shown in previous paragraphs, mitochondria contribute substantially to normal functions of adipose tissues. Although it is not clear yet if the mitochondrial dysfunction plays a causative or adaptive role in various metabolic disorders, further research in the field could reveal the correct timing of processes leading to obesity, insulin resistance, diabetes mellitus, or lipodystrophy. Compelling lines of evidence indicate that major factors contributing to mitochondrial defects in adipose tissues are (i) oxidative stress, (ii) insulin resistance, (iii) genetic factors, and also (iv) sedentary lifestyle without physical activity [93].

Oxidative stress is defined as a disturbance in the balance between the production of ROS and antioxidant defence [94]. Mitochondria are a major source of cellular free radicals that might damage proteins, lipids, and DNA. Defects in the transfer of electrons across the mitochondrial membrane can cause electrons to accumulate on the respiratory chain complexes, which results in an increase of the potential

for electrons to bind with free oxygen and stimulation of ROS production [95]. Furukawa et al. have shown that elevated levels of fatty acids increased oxidative stress via NADPH oxidase activation in cultured adipocytes. ROS then caused dysregulated production of various adipocytokines, including adiponectin, plasminogen activator inhibitor-1, IL-6, and monocyte chemoattractant protein 1 [96]. In obese mice, fat accumulation correlated with systemic oxidative stress and treatment with NADPH oxidase inhibitor reduced ROS production in adipose tissue, attenuated the dysregulation of adipocytokines, and improved diabetes, hyperlipidaemia, and hepatic steatosis in humans and mice [96]. Wang et al. have reported that higher intracellular ROS levels elicited by mitochondrial dysfunction resulted in the impairment of adipocyte function in the maintenance of glucose homeostasis through attenuation of insulin signalling, downregulation of the glucose transporter (*GLUT4*) expression, and decrease in adiponectin secretion [97].

Insulin resistance is a key defect associated with obesity and type 2 diabetes. It is defined as "a relative impairment in the ability of insulin to exert its effects on glucose, protein, and lipid metabolism in target tissues" [98]. Decreased insulin response to glucose, dyslipidaemia, and obesity frequently progress into overt type 2 diabetes with a decline in β -cell function, sustained hyperglycaemia, and increased advanced glycation end products (AGE) formation. In turn, AGE accumulation in adipose tissue may contribute to obesity-associated insulin resistance [99]. The role of mitochondria in adipose tissues in the onset and progression of insulin resistance is still a matter of controversy. Some recent findings suggest that dysregulation of mitochondrial calcium influx and efflux could be a crucial factor contributing to decreased insulin sensitivity [100] that is associated with impaired mitochondrial biogenesis and decreased expression of mitochondrial proteins in adipose tissues [101, 102]. However, mitochondrial dysfunction is not always essential for insulin resistance as reported by Martin et al. [103]. In addition, ROS-induced mitochondrial dysfunction seems to be a valid mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle, but not necessarily in adipocytes [103].

Genetic factors could play an important role in the onset and progression of obesity or type 2 diabetes mellitus. Among genes with positive associations of variants with obesity or obesity-related phenotypes, there are some deeply involved in the regulation of mitochondrial activity and biogenesis in adipose tissues, like *ADRB3* (adrenergic, β_3 receptor), *INS* (insulin), *PLIN* (perilipin), *PPAR γ* (peroxisome proliferative activated receptor, gamma), or *UCPI-UCPI3* (uncoupling proteins 1-3) [104]. In addition, impaired expression of genes related to mitochondrial functions in adipose tissues can be caused by acquired mutations of both mitochondrial and nuclear genomes. Mitochondrial DNA displays a high mutation rate due to its specific features, like limited repair, proximity to ROS production, and absence of histones [105]. Defects in the expression of mitochondria-related genes were found at the mRNA as well as the protein levels in various organs and tissues including adipose cells [106-110].

Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β seem to be of particular importance in coordination of expression

of mitochondrial and nuclear genes related to mitochondrial functions in both BAT and WAT [111, 112]. PGC-1 α is able to direct human WAT PPAR γ toward a transcriptional program linked to energy dissipation through an increased expression of UCPI [113]. Accordingly, decreased PGC-1 α mRNA levels were reported in subcutaneous fat in morbidly obese subjects. Although it is not clear whether low PGC-1 α expression is a prelude to the development of obesity or a consequence of it, upregulation of expression of thermogenic genes in white adipose tissue could offer new tool in the therapy of obesity [114].

However, it should be noted that impairment of expression of mitochondria-related genes does not necessarily lead to obesity as documented by manipulations with mitochondrial transcription factor A (TFAM), one of the major controllers of mitochondrial mass: in mice deficient in TFAM in adipocytes, activity of proteins in respiratory complexes I, III, and IV was severely compromised, which resulted in adipocyte death and inflammation in WAT and whitening of BAT [88].

Changes in human behaviour and lifestyle over the last century have resulted in a dramatic increase in the incidence of diabetes and obesity worldwide. Sedentary lifestyle, changes in work (from heavy labour to sedentary) have had an impact on human health [4, 115]. Physical activity is a major regulator of mitochondrial function in muscle cells and long-time inactivity is associated with reduced mitochondrial function and number [116].

In adipose tissues, regular physical activity and exercise training have long been known to cause increased expression and activity of mitochondrial proteins [117, 118]. In the last decade, the "beiging" of WAT associated with the expression of typical markers of BAT (like UCPI) in white adipocytes was revealed in response to exercise training [119, 120]. In rodents, even a single bout of exercise increased expression of a marker for mitochondrial biogenesis, PGC-1 α mRNA in WAT [121]. This increase was presumably induced by stimulation β -adrenergic receptors at least in visceral WAT [122]. In the subcutaneous WAT, endothelial nitric oxide synthase has been proposed to regulate training-induced increases in mitochondrial biogenesis [118].

5.2. Mitochondrial Dysfunction during Adipocyte Differentiation. There is ample evidence that any damage to the mitochondrial respiratory chain results in compromised adipocyte differentiation. Inhibition of complex I by rotenone led to the significant reduction in the expression of mitochondrial malate dehydrogenase and a number of differentiation transcription factors, like PGC-1 β , PPAR γ , C/EBP α /enhancer binding protein alpha (C/EBP α), and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). In addition, apparent decreases in the synthesis of triglycerides and ATP were reported [84]. Antimycin A, inhibitor of complex III, and oligomycin, inhibitor of ATP synthase commonly used for developing of mitochondrial dysfunction models, also prevented preadipocyte differentiation [123, 124].

High concentrations of mitochondrial ROS generated by the respiratory chain have also detrimental influence on

adipoblast proliferation and differentiation. Genetic manipulation of mitochondrial complex III revealed that ROS generated by this complex were required to initiate primary human mesenchymal stem cells differentiation [81]. Thus, the production of ROS and mitochondrial metabolism are not simply a consequence of adipogenesis but are causal factors in promoting adipocyte differentiation [81].

6. Conclusions

Adipose tissue is an extremely plastic organ capable of massive expansion, reduction, or transformation according to appropriate stimulation. Research motivated mainly by the desire to understand adipocytes in the context of obesity and related diseases resulted not only in promising data opening new ways to fight obesity, but also in the discovery of multipotent stem cells within WAT [125]. It is now widely accepted that adipose tissue acts not only as repository for excess nutrients but also as integrator and regulator of the balance between food intake and energy output. It secretes a number of substances affecting the function of several organs in the body and also the function of adipose tissue itself [51, 126, 127]. This review summarizes the main characteristics of each adipose tissue subtype and describes morphological and functional modifications focusing on mitochondria and their activity in healthy and unhealthy adipocytes. Increasing evidence in adipocyte-related mitochondrial research demonstrates the important role of mitochondria in the onset or progression of obesity and related pathologies and offers a large spectrum of potential therapeutic targets, like differentiation and transformation of adipocytes, ROS production, substrate channelling to energy dissipation, or changes in the lifestyle.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contribution

Miroslava Cedikova and Michaela Kripnerová contributed equally to this work.

Acknowledgments

This study was supported by the National Sustainability Program I (NPU I) no. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic, the Charles University Research Fund (no. P36), the Specific Student Research Project nos. 260281/2016 and 260283/2016 of the Charles University in Prague, and the Project NT 14330-3/2013.

References

- [1] A. V. B. Castro, C. M. Kolka, S. P. Kim, and R. N. Bergman, "Obesity, insulin resistance and comorbidities—mechanisms of

association," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 58, no. 6, pp. 600–609, 2014.

- [2] M. Luna-Luna, A. Medina-Urrutia, G. Vargas-Alarcón, F. Coss-Rovirosa, J. Vargas-Barrón, and Ó. Pérez-Méndez, "Adipose tissue in metabolic syndrome: onset and progression of atherosclerosis," *Archives of Medical Research*, vol. 46, no. 5, pp. 392–407, 2015.
- [3] J. F. Mission, N. E. Marshall, and A. B. Caughey, "Pregnancy risks associated with obesity," *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, vol. 42, no. 2, pp. 335–353, 2015.
- [4] P. Zimmet, K. G. M. M. Alberti, and J. Shaw, "Global and societal implications of the diabetes epidemic," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 782–787, 2001.
- [5] L. Cai, J. Lubitz, K. M. Flegal, and E. R. Pamuk, "The predicted effects of chronic obesity in middle age on medicare costs and mortality," *Medical Care*, vol. 48, no. 6, pp. 510–517, 2010.
- [6] A. Gélöőn, P. E. Roy, and L. J. Bukowiecki, "Regression of white adipose tissue in diabetic rats," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 257, no. 4, part 1, pp. E547–E553, 1989.
- [7] B. B. Lowell and J. S. Flier, "Brown adipose tissue, β_3 -adrenergic receptors, and obesity," *Annual Review of Medicine*, vol. 48, pp. 307–316, 1997.
- [8] A. Park, W. K. Kim, and K.-H. Bae, "Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells," *World Journal of Stem Cells*, vol. 6, no. 1, pp. 33–42, 2014.
- [9] M. Giralt and F. Villarroya, "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?" *Endocrinology*, vol. 154, no. 9, pp. 2992–3000, 2013.
- [10] A. Cook and C. Cowan, "Adipose," in *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, Mass, USA, 2008.
- [11] A. De Pauw, S. Tejerina, M. Raes, J. Keijer, and T. Arnould, "Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations," *The American Journal of Pathology*, vol. 175, no. 3, pp. 927–939, 2009.
- [12] X. Yin, I. R. Lanza, J. M. Swain, M. G. Sarr, K. S. Nair, and M. D. Jensen, "Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 99, no. 2, pp. E209–E216, 2014.
- [13] A. Peschechera and J. Eckel, "'Browning' of adipose tissue—regulation and therapeutic perspectives," *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 119, no. 4, pp. 151–160, 2013.
- [14] C.-H. Wang, C.-C. Wang, and Y.-H. Wei, "Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1201, pp. 157–165, 2010.
- [15] D. C. Logan, "The mitochondrial compartment," *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, no. 6, pp. 1225–1243, 2006.
- [16] Y. Zhang, X. Zeng, and S. Jin, "Autophagy in adipose tissue biology," *Pharmacological Research*, vol. 66, no. 6, pp. 505–512, 2012.
- [17] J.-A. Kim, Y. Wei, and J. R. Sowers, "Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance," *Circulation Research*, vol. 102, no. 4, pp. 401–414, 2008.
- [18] G. Benard, B. Faustin, E. Passerieux et al., "Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 291, no. 6, pp. C1172–C1182, 2006.
- [19] M. Zeviani and S. Di Donato, "Mitochondrial disorders," *Brain*, vol. 127, no. 10, pp. 2153–2172, 2004.

- [20] G. Lenaz, "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing," *Biochimica et Biophysica Acta—Bioenergetics*, vol. 1366, no. 1-2, pp. 53–67, 1998.
- [21] X. Wang, "The expanding role of mitochondria in apoptosis," *Genes and Development*, vol. 15, no. 22, pp. 2922–2933, 2001.
- [22] G. Medina-Gómez, "Mitochondria and endocrine function of adipose tissue," *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 26, no. 6, pp. 791–804, 2012.
- [23] V. Peirce, S. Carobbio, and A. Vidal-Puig, "The different shades of fat," *Nature*, vol. 510, no. 7503, pp. 76–83, 2014.
- [24] J. M. Stephens, "The fat controller: adipocyte development," *PLoS Biology*, vol. 10, no. 11, Article ID e1001436, 2012.
- [25] T. Shan, X. Liang, P. Bi, P. Zhang, W. Liu, and S. Kuang, "Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues," *Journal of Lipid Research*, vol. 54, no. 8, pp. 2214–2224, 2013.
- [26] J. Sanchez-Gurmaches, C.-M. Hung, C. A. Sparks, Y. Tang, H. Li, and D. A. Guertin, "PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors," *Cell Metabolism*, vol. 16, no. 3, pp. 348–362, 2012.
- [27] A. M. Cypess, A. P. White, C. Vernochet et al., "Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 5, pp. 635–639, 2013.
- [28] D. Vargas, W. Rosales, and F. Lizcano, "Modifications of human subcutaneous adipose after PPAR γ activation and cold exposition," *Stem Cells International*, vol. 2015, Article ID 196348, 8 pages, 2015.
- [29] M. E. Symonds, "Brown adipose tissue growth and development," *Scientifica*, vol. 2013, Article ID 305763, 14 pages, 2013.
- [30] N. Z. Jespersen, T. J. Larsen, L. Peijs et al., "A classical brown adipose tissue mrna signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans," *Cell Metabolism*, vol. 17, no. 5, pp. 798–805, 2013.
- [31] L. Z. Sharp, K. Shinoda, H. Ohno et al., "Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e49452, 2012.
- [32] S. Corvera and O. Gealekman, "Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no. 3, pp. 463–472, 2014.
- [33] A. Y. Lemoine, S. Ledoux, and E. Larger, "Adipose tissue angiogenesis in obesity," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 110, no. 4, pp. 661–669, 2013.
- [34] K. Sarjeant and J. M. Stephens, "Adipogenesis," *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, vol. 4, no. 9, Article ID a008417, 2012.
- [35] J. Orava, P. Nuutila, T. Noponen et al., "Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans," *Obesity*, vol. 21, no. 11, pp. 2279–2287, 2013.
- [36] N. Tewari, S. Awad, I. A. Macdonald, and D. N. Lobo, "Obesity-related insulin resistance: implications for the surgical patient," *International Journal of Obesity*, vol. 39, no. 11, pp. 1575–1588, 2015.
- [37] A.-L. Poher, J. Altirriba, C. Veyrat-Durebex, and F. Rohner-Jeanrenaud, "Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance," *Frontiers in Physiology*, vol. 6, article 4, 2015.
- [38] K. Schlessinger, W. Li, Y. Tan et al., "Gene expression in WAT from healthy humans and monkeys correlates with FGF21-induced browning of WAT in mice," *Obesity*, vol. 23, no. 9, pp. 1818–1829, 2015.
- [39] K. A. Virtanen, M. E. Lidell, J. Orava et al., "Functional brown adipose tissue in healthy adults," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1518–1525, 2009.
- [40] A. M. Cypess, S. Lehman, G. Williams et al., "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1509–1517, 2009.
- [41] M. Stephens, M. Ludgate, and D. A. Rees, "Brown fat and obesity: the next big thing?" *Clinical Endocrinology*, vol. 74, no. 6, pp. 661–670, 2011.
- [42] J. Wu, P. Boström, L. M. Sparks et al., "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human," *Cell*, vol. 150, no. 2, pp. 366–376, 2012.
- [43] T. B. Waldén, I. R. Hansen, J. A. Timmons, B. Cannon, and J. Nedergaard, "Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, 'brite,' and white adipose tissues," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 302, no. 1, pp. E19–E31, 2012.
- [44] J. Himms-Hagen, A. Melnyk, M. C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli, and S. Cinti, "Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 279, no. 3, pp. C670–C681, 2000.
- [45] M. Morrioni, A. Giordano, M. C. Zingaretti et al., "Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 48, pp. 16801–16806, 2004.
- [46] Q. A. Wang, C. Tao, R. K. Gupta, and P. E. Scherer, "Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 10, pp. 1338–1344, 2013.
- [47] R. De Matteis, F. Lucertini, M. Guescini et al., "Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 23, no. 6, pp. 582–590, 2013.
- [48] C. Sun, R. Zeng, G. Cao, Z. Song, Y. Zhang, and C. Liu, "Vibration training triggers brown adipocyte relative protein expression in rat white adipose tissue," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 919401, 10 pages, 2015.
- [49] A. Bartelt and J. Heeren, "Adipose tissue browning and metabolic health," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 10, no. 1, pp. 24–36, 2014.
- [50] F. Forner, C. Kumar, C. A. Luber, T. Fromme, M. Klingenspor, and M. Mann, "Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions," *Cell Metabolism*, vol. 10, no. 4, pp. 324–335, 2009.
- [51] S. Boudina and T. E. Graham, "Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue," *Experimental Physiology*, vol. 99, no. 9, pp. 1168–1178, 2014.
- [52] C. M. Oller do Nascimento, E. B. Ribeiro, and L. M. Oyama, "Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 81, no. 3, pp. 453–466, 2009.
- [53] J. Orava, P. Nuutila, M. E. Lidell et al., "Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin," *Cell Metabolism*, vol. 14, no. 2, pp. 272–279, 2011.

- [54] M. C. Sugden and M. J. Holness, "Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases," *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 112, no. 3, pp. 139–149, 2006.
- [55] D. G. Nicholls and R. M. Locke, "Thermogenic mechanisms in brown fat," *Physiological Reviews*, vol. 64, no. 1, pp. 1–64, 1984.
- [56] B. Cannon and J. Nedergaard, "Brown adipose tissue: function and physiological significance," *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 1, pp. 277–359, 2004.
- [57] S. Kajimura and M. Saito, "A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis," *Annual Review of Physiology*, vol. 76, pp. 225–249, 2014.
- [58] R. A. Busiello, S. Savarese, and A. Lombardi, "Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism," *Frontiers in Physiology*, vol. 6, article 36, 2015.
- [59] D. G. Nicholls, "Stoichiometries of proton translocation by mitochondria," *Biochemical Society Transactions*, vol. 5, no. 1, pp. 200–203, 1977.
- [60] F. Bouillaud, E. Couplan, C. Pecqueur, and D. Ricquier, "Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics*, vol. 1504, no. 1, pp. 107–119, 2001.
- [61] M. Nibbelink, K. Moulin, E. Arnaud, C. Duval, L. Pénicaud, and L. Casteilla, "Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 50, pp. 47291–47295, 2001.
- [62] M. Kim, T. Goto, R. Yu et al., "Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system," *Scientific Reports*, vol. 5, Article ID 18013, 2015.
- [63] J. Nedergaard and B. Cannon, "The 'novel' 'uncoupling' UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions," *Experimental Physiology*, vol. 88, no. 1, pp. 65–84, 2003.
- [64] K. S. Echtay, "Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role?" *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 43, no. 10, pp. 1351–1371, 2007.
- [65] F. E. Sluse, W. Jarmuszkiwicz, R. Navet, P. Douette, G. Mathy, and C. M. Sluse-Goffart, "Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics*, vol. 1757, no. 5–6, pp. 480–485, 2006.
- [66] G. Mattiasson and P. G. Sullivan, "The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 8, no. 1–2, pp. 1–38, 2006.
- [67] C. Pecqueur, M.-C. Alves-Guerra, C. Gelly et al., "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 12, pp. 8705–8712, 2001.
- [68] G. G. Power, "Biology of temperature: the mammalian fetus," *Journal of Developmental Physiology*, vol. 12, no. 6, pp. 295–304, 1989.
- [69] B. B. Lowell and B. M. Spiegelman, "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis," *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 652–660, 2000.
- [70] M. Zhang, M. Wang, and Z.-T. Zhao, "Uncoupling protein 2 gene polymorphisms in association with overweight and obesity susceptibility: a meta-analysis," *Meta Gene*, vol. 2, no. 1, pp. 143–159, 2014.
- [71] A. Acosta, M. Camilleri, A. Shin et al., "Association of UCP-3 rs1626521 with obesity and stomach functions in humans," *Obesity*, vol. 23, no. 4, pp. 898–906, 2015.
- [72] A. L. Carey, C. Vorlander, M. Reddy-Luthmoodoo et al., "Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e91997, 2014.
- [73] A. T. Akhmedov, V. Rybin, and J. Marín-García, "Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart," *Heart Failure Reviews*, vol. 20, no. 2, pp. 227–249, 2015.
- [74] C. Cornelius, A. Trovato Salinaro, M. Scuto et al., "Cellular stress response, sirtuins and UCP proteins in Alzheimer disease: role of vitagenes," *Immunity and Ageing*, vol. 10, no. 1, article 41, 2013.
- [75] D. Robbins and Y. Zhao, "New aspects of mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and their roles in tumorigenesis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 8, pp. 5285–5293, 2011.
- [76] L. Wilson-Fritch, S. Nicoloso, M. Chouinard et al., "Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 9, pp. 1281–1289, 2004.
- [77] E. Yehuda-Shnaidman, B. Buehrer, J. Pi, N. Kumar, and S. Collins, "Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis," *Diabetes*, vol. 59, no. 10, pp. 2474–2483, 2010.
- [78] Z. López-Ibarra, J. Modrego, M. Valero-Muñoz et al., "Metabolic differences between white and brown fat from fasting rabbits at physiological temperature," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 54, no. 2, pp. 105–113, 2015.
- [79] J. Kopecký, M. Rossmeis, P. Flachs, K. Bardová, and P. Brauner, "Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes," *Biochemical Society Transactions*, vol. 29, part 6, pp. 791–797, 2001.
- [80] F. M. Gregoire, C. M. Smas, and H. S. Sul, "Understanding adipocyte differentiation," *Physiological Reviews*, vol. 78, no. 3, pp. 783–809, 1998.
- [81] K. V. Tormos, E. Anso, R. B. Hamanaka et al., "Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation," *Cell Metabolism*, vol. 14, no. 4, pp. 537–544, 2011.
- [82] D. Liu, Y. Lin, T. Kang et al., "Mitochondrial dysfunction and adipogenic reduction by prohibitin silencing in 3T3-L1 cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e34315, 2012.
- [83] L. Wilson-Fritch, A. Burkart, G. Bell et al., "Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 3, pp. 1085–1094, 2003.
- [84] R.-H. Lu, H. Ji, Z.-G. Chang, S.-S. Su, and G.-S. Yang, "Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation," *Molecular Biology Reports*, vol. 37, no. 5, pp. 2173–2182, 2010.
- [85] K. Kajimoto, H. Terada, Y. Baba, and Y. Shinohara, "Essential role of citrate export from mitochondria at early differentiation stage of 3T3-L1 cells for their effective differentiation into fat cells, as revealed by studies using specific inhibitors of mitochondrial di- and tricarboxylate carriers," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 85, no. 1, pp. 46–53, 2005.
- [86] B. Li, J. Shin, and K. Lee, "Interferon-stimulated gene ISG12b1 inhibits adipogenic differentiation and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells," *Endocrinology*, vol. 150, no. 3, pp. 1217–1224, 2009.

- [87] Y. R. Yang, H.-J. Jang, S.-S. Choi et al., "Obesity resistance and increased energy expenditure by white adipose tissue browning in *Oga*^{+/-} mice," *Diabetologia*, vol. 58, no. 12, pp. 2867–2876, 2015.
- [88] C. Vernochet, F. Damilano, A. Mourier et al., "Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 10, pp. 4408–4419, 2014.
- [89] M. Keuper, M. Jastroch, C.-X. Yi et al., "Spare mitochondrial respiratory capacity permits human adipocytes to maintain ATP homeostasis under hypoglycemic conditions," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 2, pp. 761–770, 2014.
- [90] J. Dong, Y. Dong, Y. Dong, F. Chen, W. E. Mitch, and L. Zhang, "Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues," *International Journal of Obesity*, vol. 40, no. 3, pp. 434–442, 2016.
- [91] M. K. Montgomery and N. Turner, "Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update," *Endocrine Connections*, vol. 4, no. 1, pp. R1–R15, 2014.
- [92] D. C. Chan, "Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development," *Cell*, vol. 125, no. 7, pp. 1241–1252, 2006.
- [93] N. Turner and L. K. Heilbronn, "Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance?" *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 19, no. 9, pp. 324–330, 2008.
- [94] D. J. Betteridge, "What is oxidative stress?" *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 49, no. 2, supplement 1, pp. 3–8, 2000.
- [95] D. L. Johannsen and E. Ravussin, "The role of mitochondria in health and disease," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 9, no. 6, pp. 780–786, 2009.
- [96] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro et al., "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 12, pp. 1752–1761, 2004.
- [97] C.-H. Wang, C.-C. Wang, H.-C. Huang, and Y.-H. Wei, "Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes," *The FEBS Journal*, vol. 280, no. 4, pp. 1039–1050, 2013.
- [98] C. R. Kahn, "Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 27, no. 12, supplement 2, pp. 1893–1902, 1978.
- [99] F. Boyer, J. B. Vidot, A. G. Dubourg, P. Rondeau, M. F. Essop, and E. Bourdon, "Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 534873, 9 pages, 2015.
- [100] C.-H. Wang, T.-F. Tsai, and Y.-H. Wei, "Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in insulin insensitivity of mammalian cells," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1350, pp. 66–76, 2015.
- [101] S. Heinonen, J. Buzkova, M. Muniandy et al., "Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity," *Diabetes*, vol. 64, no. 9, pp. 3135–3145, 2015.
- [102] L. N. Sutherland, L. C. Capozzi, N. J. Turchinsky, R. C. Bell, and D. C. Wright, "Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 295, no. 5, pp. E1076–E1083, 2008.
- [103] S. D. Martin, S. Morrison, N. Konstantopoulos, and S. L. McGee, "Mitochondrial dysfunction has divergent, cell type-dependent effects on insulin action," *Molecular Metabolism*, vol. 3, no. 4, pp. 408–418, 2014.
- [104] A. J. Walley, A. I. F. Blakemore, and P. Froguel, "Genetics of obesity and the prediction of risk for health," *Human Molecular Genetics*, vol. 15, no. 2, pp. R124–R130, 2006.
- [105] G. C. Kujoth, P. C. Bradshaw, S. Haroon, and T. A. Prolla, "The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging," *PLoS Genetics*, vol. 3, article e24, 2007.
- [106] J. M. Kristensen, V. Skov, S. J. Petersson et al., "A PGC-1 α - and muscle fibre type-related decrease in markers of mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of humans with inherited insulin resistance," *Diabetologia*, vol. 57, no. 5, pp. 1006–1015, 2014.
- [107] V. Skov, D. Glintborg, S. Knudsen et al., "Reduced expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome," *Diabetes*, vol. 56, no. 9, pp. 2349–2355, 2007.
- [108] C.-L. Gao, C. Zhu, Y.-P. Zhao et al., "Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 320, no. 1–2, pp. 25–33, 2010.
- [109] M. A. Kamel, M. H. Helmy, M. Y. Hanafi, S. A. Mahmoud, and H. Abo Elfetoh, "Impaired peripheral glucose sensing in F1 offspring of diabetic pregnancy," *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 70, no. 3, pp. 685–699, 2014.
- [110] M. Wang, X. C. Wang, Z. Y. Zhang, B. Mou, and R. M. Hu, "Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in multiple insulin-sensitive tissues of humans with type 2 diabetes mellitus," *Journal of International Medical Research*, vol. 38, no. 3, pp. 769–781, 2010.
- [111] P. Puigserver, Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman, "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis," *Cell*, vol. 92, no. 6, pp. 829–839, 1998.
- [112] R. Pardo, N. Enguix, J. Lasheras, J. E. Feliu, A. Kralli, and J. A. Villena, "Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, Article ID e26989, 2011.
- [113] C. Tiraby, G. Tavernier, C. Lefort et al., "Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 35, pp. 33370–33376, 2003.
- [114] R. K. Semple, V. C. Crowley, C. P. Sewter et al., "Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects," *International Journal of Obesity*, vol. 28, no. 1, pp. 176–179, 2004.
- [115] P. Zimmet, "Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted?" *Journal of Internal Medicine*, vol. 247, no. 3, pp. 301–310, 2000.
- [116] H. Hoppeler and M. Flück, "Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 35, no. 1, pp. 95–104, 2003.
- [117] B. Stallknecht, J. Vinten, T. Ploug, and H. Galbo, "Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 261, no. 3, part 1, pp. E410–E414, 1991.

- [118] E. Trevellin, M. Scorzeto, M. Olivieri et al., "Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms," *Diabetes*, vol. 63, no. 8, pp. 2800–2811, 2014.
- [119] J. G. Knudsen, M. Murholm, A. L. Carey et al., "Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCPI expression in subcutaneous white adipose tissue," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Article ID e84910, 2014.
- [120] S. Ringholm, J. Grønnet Knudsen, L. Leick, A. Lundgaard, M. Munk Nielsen, and H. Pilegaard, "PGC-1 α is required for exercise- and exercise training-induced UCPI up-regulation in mouse white adipose tissue," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e64123, 2013.
- [121] L. N. Sutherland, M. R. Bomhof, L. C. Capozzi, S. A. U. Basaraba, and D. C. Wright, "Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue," *The Journal of Physiology*, vol. 587, no. 7, pp. 1607–1617, 2009.
- [122] K. I. Stanford, R. J. Middelbeek, K. L. Townsend et al., "A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis," *Diabetes*, vol. 64, no. 6, pp. 2002–2014, 2015.
- [123] A. Carrière, M.-C. Carmona, Y. Fernandez et al., "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 39, pp. 40462–40469, 2004.
- [124] Y. Zhang, G. Marsboom, P. T. Toth, and J. Rehman, "Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e77077, 2013.
- [125] W. P. Cawthorn, E. L. Scheller, and O. A. MacDougald, "Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future," *Journal of Lipid Research*, vol. 53, no. 2, pp. 227–246, 2012.
- [126] M. A. Exley, L. Hand, D. O'Shea, and L. Lynch, "Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity," *Journal of Endocrinology*, vol. 223, no. 2, pp. R41–R48, 2014.
- [127] C. H. Saeely, K. Geiger, and H. Drexel, "Brown versus white adipose tissue: a mini-review," *Gerontology*, vol. 58, no. 1, pp. 15–23, 2012.

PŘÍLOHA V

MÜLLEROVÁ, D., PEŠTA, M., DVOŘÁKOVÁ, J., ČEDÍKOVÁ, M., KULDA, V., DVOŘÁK, P., BOUCHALOVÁ, V., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KUNCOVÁ, J., LANGMAJEROVÁ, J. a L. MÜLLER. Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiological Research* [online]. 2017 Sep 22;66(4):653-662. PMID: 28406693.

Polychlorinated Biphenyl 153 in Lipid Medium Modulates Differentiation of Human Adipocytes

D. MULLEROVA¹, M. PESTA², J. DVORAKOVA¹, M. CEDIKOVA³, V. KULDA⁴, P. DVORAK², V. BOUCHALOVA¹, M. KRALICKOVA^{5,6}, V. BABUSKA⁴, J. KUNCOVA^{3,6}, J. LANGMAJEROVA¹, L. MULLER⁷

¹Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ²Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ³Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁴Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁵Department of Histology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁶Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁷Department of Cybernetics, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia in Pilsen, Pilsen, Czech Republic

Received December 18, 2015

Accepted December 22, 2016

On-line April 12, 2017

Summary

Emerging evidence indicates that polychlorinated biphenyls (PCBs) are involved in the development of diabetes mellitus in the obese. The purpose of this study was to determine mechanisms by which PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachloro-biphenyl) could influence diet-induced obesity and insulin resistance during adipogenesis. Lineage of h-ADMSCs was differentiated either as control (differentiation medium only), or with lipid vehicle modeling high fat nutrition (NuTRiflex) or lipid free vehicle (dimethylsulfoxide) for 28 days with or without PCB 153 daily co-exposure (in three concentrations 0.1, 1, and 10 μ M). Gene expression analyses were performed using RT-qPCR at days 4, 10, 21, 24, 28; protein levels Akt and phosphorylated Akt (Phospho-Akt) by Western blot at days 4, and 21. PCB 153 treatment of h-ADMSCs only in lipid vehicle was associated with down regulation of key master genes of adipogenesis: PPAR γ , SREBP-1, PPARGC1B, and PLIN2 during the whole process of differentiation; and with increased Akt and decreased Phospho-Akt protein level at day 21. We have shown that PCB 153, in concentration 0.1 μ M, has a potential in lipid rich environment to modulate differentiation of adipocytes. Because European and U.S. adults have been exposed to

PCB 153, this particular nutrient-toxicant interaction potentially impacts human obesity and insulin sensitivity.

Key words

Adipogenesis • PCBs • Gene expression • Phospho-Akt/Akt

Corresponding author

D. Mullerova, Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Lidická 4, Pilsen, 301 66, Czech Republic. E-mail: dana.mullerova@lfp.cuni.cz

Introduction

Obesity is a rapidly growing pandemic. Visceral obesity is often seen in association with hypertension, dyslipidemia, insulin resistance and, type 2 diabetes mellitus (T2DM). T2DM is a complex condition resulting from the interaction between genetic and environmental factors, especially from unhealthy diets and decreased physical activity. However, emerging evidence from epidemiologic studies has also suggested the contribution of some environmental contaminants, including polychlorinated biphenyls (PCBs) to the observed

growing T2DM (Lee *et al.* 2006), and the metabolic syndrome (Lee *et al.* 2007). PCBs are polyhalogenated aromatic hydrocarbons consisting of up to 10 chlorine atoms attached to a biphenyl group. A total of 1.3 million tons of PCBs consisting of 130 individual congeners were manufactured prior 1977 (Breivik *et al.* 2002) for use in electrical and other industrial applications. In the former Czechoslovakia, PCB were marketed as technical mixtures under the trade name "Delor" and were produced in the amount of about 21.500 tons in Eastern Slovakia from 1959 to 1984, when the production was finally abolished (Pavuk *et al.* 2004). About 11.600 tons of this amount were used inside the former Czechoslovakia (Cerna *et al.* 2008). Unfortunately, thanks to this inheritance, the industrial areas of the Czech Republic have one of the highest PCB burdens of all Europe (Cerna *et al.* 2010). Although PCBs production and sale have been banned in many industrial countries for over 30 years, they are resistant to biodegradation and thus continue to be present in the diet however their exposure is continuously decreased. Contaminated food, especially fatty fish, meat and milk products, is still a main source of their exposure to general population.

Their concentration in human tissue is generally monitored by using examinations of human breast milk and also data from Europe showing their decreased concentration. 'Non-dioxin-like' PCB 153, 138, and 180 are the main congeners which show the highest concentration and are most frequently found in breast milk (Bencko *et al.* 1998). As well all of American adult NHANES participants had detectable circulating PCB levels in humans and PCB 153 has the highest median serum concentration of any single congeners (Cave *et al.* 2010).

Adipose tissue is a main storage site for many lipophilic persistent organic pollutants, including PCBs. Their structure determines their ability to interact with nuclear receptors, and thus they may modulate differentiation, metabolism, and secretory functions of adipose tissue (see review Mullerova and Kopecky 2007).

The effect of PCB 153, has not been adequately studied in models of adipocyte differentiation, likewise, in models with nutrient-toxicant interactions, which appear to be important in diet-induced obesity/metabolic syndrome (Hennig *et al.* 2007).

The purpose of this study is i) to determine, in a model of differentiating adipocytes, if PCB 153 chronic exposure itself is sufficient to alter expression of genes

involved in adipocyte maturation; and ii) to determine if PCB 153 diluted in lipid vehicle simulating fatty diet worsens differentiation of adipocytes and their function by exacerbating previously implicated mechanisms such as insulin resistance.

Materials and Methods

In order to verify a hypothesis that PCB 153 may modify differentiation of adipocytes, and their function, expression of selected genes by RT real-time PCR and proteins by Western blot as markers of differentiation and insulin sensitivity were measured in a cell culture of human adipose derived mesenchymal stem cells (h-ADMSCs), which were differentiated either control (differentiation medium only, DM) or with lipid vehicle NuTRIflex (LV), or with dimethylsulfoxide vehicle (SV) for 28 days with or without PCB 153 daily co-exposure (in three concentrations 0.1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M). Monitoring of gene expression was performed at days 4, 10, 21, 24, 28 of differentiation.

Cell culture differentiation and PCB 153 treatment

h-ADMSCs, isolated from a single female donor from subcutaneous adipose tissue and characterized by flow cytometry were obtained from the Invitrogen (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) and cultured in 6-well plate (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) in commercially available culture medium MesenPRO RS™ Medium supplemented with MesenPRO RS™ Growth Supplement with reduced serum level (2%), 1% L-glutamine and 1% Gentamicine (all Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany).

For adipogenic differentiation, h-ADMSCs were seeded with a total number of 1×10^5 cells in a 6-well cell culture plate and cultured according to the manufacturer's instructions in StemPro® Adipogenesis Differentiation medium supplemented with 1% Gentamicine. The medium was changed every 3 days up to a total incubation time of 28 days.

The cells were maintained and cultured into differentiated adipocytes under 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were incubated either control DM, containing insulin 1250 IU/l (glucose 23 mM, cholesterol 0.37 mM, triacylglyceroles (TG) 0.08 mM), or DM with SV or DM with LV (high fat medium, imitative high fat diet, NuTRIflex® Lipid peri: glucose 23 mM, cholesterol 0.35 mM, TG 1.069 mM).

PCB 153 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), was administered either in LV or in SV at three different concentrations (0.1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M) vs. controls (DM, DM+LV, DM+SV). A gene expression analyses were performed at days 4, 10, 21, 24 and 28. Thus nine different treatment groups were evaluated in this fashion: DM, DM+LV, DM+SV, DM+LV+PCB 153-0.1 μ M, DM+LV+PCB 153-1 μ M, DM+LV+PCB 153-10 μ M, DM+SV+PCB 153-0.1 μ M, DM+SV+PCB 153-1 μ M, DM+SV+PCB 153-10 μ M.

Real time-PCR

Total RNA was isolated from a pellet of cells (approximately 10^6 cells) by FastRNAPro Green Kit (QBIogene, Irvine, CA, USA). Reverse transcription (RT) was performed from 250 ng of total RNA with Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers as primers. Table 1 shows the sequences of primers and corresponding UPL probes generated by ProbeFinder Software (Roche, Mannheim, Germany). The primers were synthesized by East Port Praha (Prague, Czech Republic). A quantitative estimation was performed in technical duplicates using UPL probes (Table 1) on Stratagene Mx3005P apparatus (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). All samples were also assessed for the expression of reference genes GUSB, HPRT, YWHAZ. Selection of the most suitable reference genes was done prior to the study (unpublished data). The results are presented as normalized values ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ algorithm) using geometric mean of quantification (Ct) of three reference genes (GUSB, HPRT, YWHAZ) (Kozera and Rapacz 2013).

Determination of Phospho-Akt/Akt by Western blot

On days 4 and 21, cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing protease inhibitor cocktail (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Switzerland). The protein was quantified using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 3 μ g aliquots of protein were electrophoresed by SDS-PAGE and transferred to Immun-Blot PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Protein levels of Akt and Phospho-Akt were determined by PhosphoPlus Akt (Ser473) Antibody Duet

kit (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) containing primary antibodies Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb (used in 1:2000 dilution) and AktT (pan) (C67E7) Rabbit mAb (used in 1:1000 dilution). Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (1:1000 dilution; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) was used as a secondary antibody. For an internal control and purpose of relative quantification, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was detected by GAPDH (14C10) Rabbit mAb (1:2000 dilution; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA).

Immune complexes were visualized using WesternBright ECL HRP substrate (Advansta, Menlo Park, CA, USA) and the luminescent signal was detected and relative band intensity was analyzed with a digital documentation system and software Alliance 4.7 (UVitec, Cambridge, UK).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Matlab Statistics Tool Box version R2012a for Windows. Non-parametric Wilcoxon two-sided signed-rank test was performed for statistical analysis. P-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Also non-parametric Friedman's test was performed for statistical analyses of genes expression during the monitored days of differentiation between by PCB 153 exposed cells and controls. Friedman's test was calculated to assess whether there was a significant effect of the particular concentrations of PCB 153 on the temporal changes in gene expression.

Results

PCB 153 treatment altered mRNA expression of genes involved in differentiation of adipocytes cultured in LV, but had no effect on adipocytes cultured in SV in comparison to a control with DM only

Gene expression was assessed in h-ADMSCs during the process of differentiation to analyze potential changes in expression of selected genes keeping cells in pluripotent state – OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), NANOG (nanog homeobox). PCB 153 treatment altered these gene expressions only in differentiating adipocytes cultivated in LV+DM, where NANOG gene expression in LV+DM+PCB 153 (0.1 and 1 μ M) was significantly decreased vs. both LV+DM or DM ($p < 0.05$), but had no effect in SV+DM. OCT4 gene

expression was altered by PCB 153 depending on concentration, while 0.1 μM reduced, and 1 μM increased OCT4 expression ($p < 0.05$). There was no statistical difference between DM and PCB treated cell cultures in expression of SOX2.

PCB 153 exposure altered gene expression of mRNA of proteins involved in lipid storage in ongoing process of differentiation

PLIN 2 (perilipin 2) expression was decreased in LV+DM+PCB 153 (0.1 μM) vs. LV+DM ($p < 0.05$). Although there was a non-significant trend towards higher PLIN 2 expression in LV vs. DM ($p = 0.13$) we have seen the similar pattern in dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) exposure (Mullerova et al. 2016), where LV+DM increased expression of PLIN 2 vs. DM, and this increase was stifled by DDE exposure (Mullerova et al. 2016). No alterations were seen in PCB 153 co-exposure in SV+DM.

PCB 153 exposure down-regulated gene expression of main regulators of adipogenesis PPAR γ , SREBP-1, and PPARGC1B

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand activated transcription factors. It is highly expressed in adipose tissue and it seems to be a main regulator of adipogenesis (Ni et al. 2013). PPAR γ expression was in comparison to DM significantly decreased in LV+DM and in LV+DM+PCB 153 in concentrations 10 μM and 0.1 μM vs. DM ($p < 0.05$), moreover there was a significant difference between LV+DM and LV+DM+PCB 153 in concentration 0.1 μM , where this concentration further intensified reduction of PPAR γ gene expression (Fig. 1).

SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein-1) is also involved in adipogenesis. PCB 153 in concentrations 0.1 and 1 μM reduced gene expression of SREBP-1 in comparison to DM ($p < 0.05$) or to LV+DM, however in case of concentration 0.1 μM only at p value 0.07. There was a significant difference in SREBP-1 expression between LV+DM and DM ($p < 0.05$) (Fig. 1).

Expression of PPARGC1B (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β) mRNA which is induced during white and brown adipocyte differentiation, and regulates mitochondrial oxidative metabolism, was significantly decreased in LV+DM+PCB 153 in concentrations 10 and 0.1 μM vs. DM ($p < 0.05$) (Fig. 1). PPARGC1B mRNA is highly

responsive to environmental cues and coordinate metabolic gene programs through interaction with transcription factors and chromatin-remodeling proteins.

LV, but not PCB 153 exposure altered gene expression of enzymes involved in adipocyte lipid metabolism

There were also evident alterations in gene expression of enzymes involved in fatty acids *de novo* synthesis (FASN, fatty acid synthase) and gene implicated in TG lipolysis by hormone-sensitive lipase (LIPE), under LV+DM treatment vs. DM, however without any additional effects of PCB 153 exposure. FASN and LIPE gene expressions were statistically significantly decreased in LV+DM and LV+DM+PCB 153 in all examined concentrations (0.1 μM , 1 μM , and 10 μM), in comparison to DM, however there was not a statistical difference between LV+DM and LV+DM+PCB exposed cultures. Transcription of FASN gene can be activated by stimulatory factors acting through SREBP-1.

PCB 153 exposure altered gene expression of proteins involved in adipocyte glucose metabolism and insulin sensitivity

No significant differences were seen in INSR (insulin receptor) or in AKT2 (protein kinase B) genes expression, apart from a statistical difference between LV+DM+PCB 153, in 0.1 μM vs. LV+DM where the expression is significantly lower ($p < 0.05$).

There were not found any differences in expression of ACLY (ATP citrate lyase) gene after exposure of PCB 153 in comparison to DM or DM+LV or DM+SV.

PCB 153 altered Phospho-Akt levels and Phospho-Akt/Akt measured by Western blot although the effect is opposite at day 4 and 21 of ongoing differentiation

Although Akt gene expression in LV+DM, and much more in all three PCB 153 concentrations, especially in 0.1 μM and 1 μM co-exposed cultures, was reduced in comparison to DM on day 4 of differentiation, Phospho-Akt levels were doubled in LV+DM and in all these co-exposed cultures in comparison to DM. However, on day 21 it was completely vice versa. Relation of Phospho-Akt to Akt was higher on day 4, and lower on day 21 in LV+DM, and more profound PCB in PCB 153 co-exposed cultures than DM, once again especially in concentrations 0.1 and 1 μM (Fig. 2).

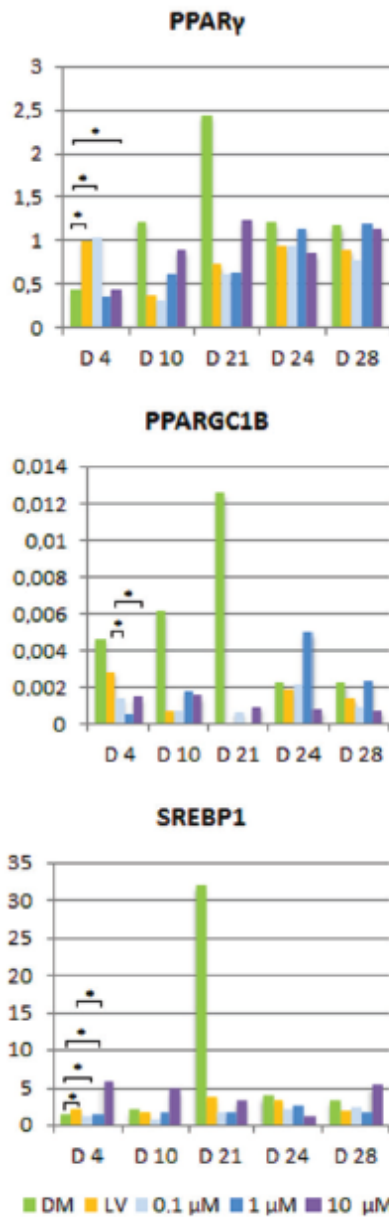


Fig. 1. PCB 153 chronic co-exposure down-regulates PPAR γ , PPARGC1B, SREBP-1 gene expression. DM – differentiation medium, LV – differentiation medium with lipid vehicle, 0.1 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 0.1 μ M, 1 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 1 μ M, 10 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 10 μ M, D4, D10, D21, D24, D28 – days 4, 10, 21, 24, 28. PPAR γ ($p < 0.05$) in: DM vs. LV+DM; DM vs. LV+DM+PCB 153 (10 μ M and 0.1 μ M); LV+DM vs. LV+DM+PCB 153 (0.1 μ M). PPARGC1B ($p < 0.05$) in: DM vs. LV+DM+PCB 153 (0.1 μ M and 10 μ M). SREBP-1 ($p < 0.05$) in: DM vs. LV+DM; DM vs. LV+DM+PCB 153 (0.1 μ M and 1 μ M); DM+LV vs. LV+DM+PCB 153 (1 μ M), $p = 0.07$ in: DM+LV vs. LV+DM+PCB 153 (0.1 μ M).

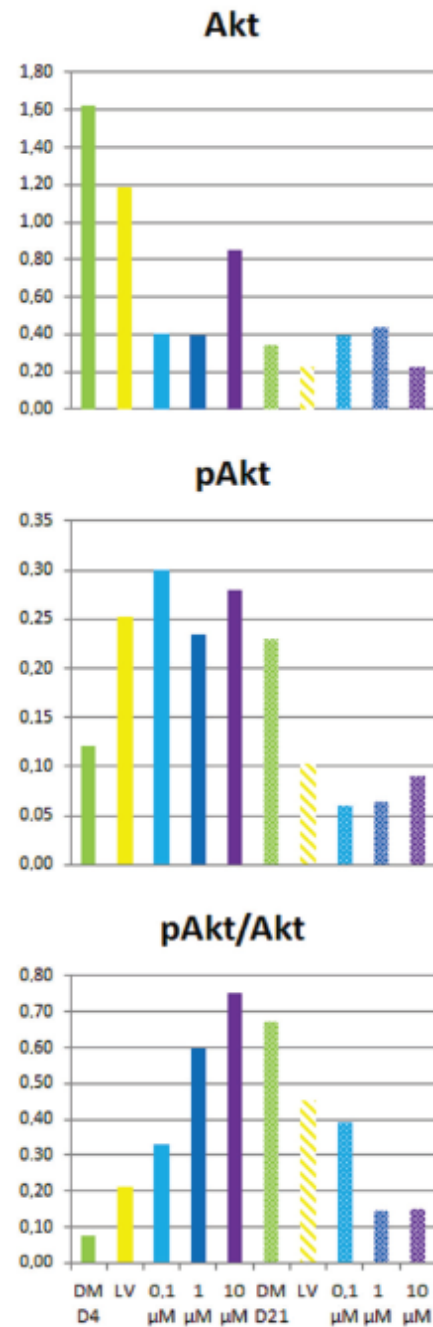


Fig. 2. PCB 153 chronic co-exposure alters Phospho-Akt levels and Phospho-Akt/Akt measured by Western blot. DM – differentiation medium, LV – differentiation medium with lipid vehicle, 0.1 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 0.1 μ M, 1 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 1 μ M, 10 μ M – differentiation medium with lipid vehicle with PCB 153 concentration 10 μ M, D4 – day 4, D21 – day 21.

Table 1. Primer sequences for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) with Universal Probe Library probes.

Symbol	Gene name	Function	Primer sequence 5'-3'	UPL probe
Reference genes				
GUSB	β -glucuronidase	Lysosomal breakdown of glycosaminoglycans	CGCCCTGCCTAICTGTATTC TCCACACAGGGAGTGTAG	57
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	Purine salvage pathway	TGACCTTGATTTATTGGCATACC CGAGCAAGAGCGTTCAGTCCT	73
YWHAZ	14-3-3 protein zeta	Signal transduction regulating adaptor	GCAATTTACTGAGAGACAACCTTGACA TGGAAAGGCCGGTTAAITTT	2
Monitoring of differentiation				
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4	Homeodomain transcription factor involved in the self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells	AGCAAAACCCGGAGGAGT CCACATCGGCCTGTGTATATC	35
NANOG	Nanog homeobox	Transcription factor involved in the self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells	ATGCCCTCACAGGAGACTGT AAGTGGTGTGTTGGCCTTIG	31
SOX2	SRY-box 2	Transcription factor essential for maintaining pluripotency of undifferentiated embryonic stem cells	TTGCTGCCCTCTTTAAGACTAGGA CTGGGGCTCAAACTTCTCTC	35
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ	Regulation of fatty acid storage and glucose metabolism	GACAGGAAAGACACAGACAAAATC GGGGTGTGTGTTGAACTGTG	7
PPARGC1B	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	Stimulator of some transcription factors and nuclear receptors activities	GGCAGGCCCTCAGATCTAATAA TCA TGGGAGCCCTCTGTCT	56
PLIN2	Perilipin 2, ADRP	Surface protein of intracellular lipid storage droplets	TCAGCTCCATCTACTGTTCACC CCTGAATTTTCTGATTGGCACT	72
Adipocyte metabolism and its regulation				
INSR	Insulin receptor	Receptor tyrosine kinase which mediates the actions of insulin	GCTGGATTATTGCCCTCAAAGG TGAGAACTCTCAGACTCGAATGG	54
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	Serine/threonine-protein kinases of signal transduction which regulate metabolism, proliferation, cell survival, growth and angiogenesis	CTCACACAGTCACCCGAGAGC	65
FASN	Fatty acid synthase	Multifunctional protein of fatty acids synthesis	TGGGTCTGGAAGGCCATACTT CAGGCACACACGATGGAC	11
SREBP-1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein	Transcription factor binding to the sterol regulatory element-1	CGGAGTGAATCTGGGTGAT CGCTCTCCAATCAATGACA	77
ACLY	ATP citrate lyase	Synthesis of cytosolic acetyl-CoA needed for lipid synthesis	TGCCAAGACAGCAGATTTA CGGACTTGGCAGAGGTAG	46
LIPE	Hormone-sensitive lipase	Hydrolysis of triglycerides	TGCTCTGAAATTTGCCCTTGG CGCTGGAGGAGTCTCTT	3

Discussion

PCBs are known to concentrate within adipose tissue. Our aim was to evaluate effects of chronic exposure of h-ADMSCs to PCB 153 during the ongoing process of differentiation.

Chronic toxicity in this study was monitored by morphology, differentiation potential towards adipogenic lineage, and especially by expression analysis of 13 genes, taking part in differentiation and as well in functions of matured adipocytes, and the level of active Akt protein (Phospho-Akt).

PCB 153 levels were similar to those found in human lipid adjusted serum 10-1260 ng/g (Mullerova *et al.* 2015). Therefore, the PCB 153 dose in our study reflected the serum levels observed in obese human populations.

Adipogenesis and lipogenesis are governed by a vast number of enzymes that act together along with key hormones and metabolites to regulate fat cell metabolism. Differentiation of h-ADMSCs, adipocyte precursors, is driven by a cascade of events controlled by transcription regulators, coactivators, and cell-cycle controls. This entire process is closely regulated at the transcriptional level.

h-ADMSCs were induced to differentiate *in vitro* by means of DM containing an external cue, such as insulin, glucocorticoids and/or molecules that can increase intracellular cAMP. These cues trigger the beginning of a transcriptional cascade composed of a network of proteins that mediate the functions of adipocytes.

We did not observe any effect of PCB 153 on adipogenesis in the absence of high fat vehiculum/feeding, however, there were alterations of gene expressions in case of fat vehiculum with PCB 153. Similarly Wahlang *et al.* (2013) documented that PCB 153 is a relevant "second hit" mechanism in the genesis and progression of obesity occurring in the context of a high fat diet. In consistency with findings of a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts, where a low-level exposure to PCB was inversely associated with fetal growth (Govarts *et al.* 2012), in our study the concentration of PCB 153 at lower concentration 0.1 μM and 1 μM , had the more profound effect on adipogenesis in comparison to the highest tested concentration 10 μM . Similarly a non-linear pattern between persistent organic pollutants exposure and serum lipids/obesity has been shown (Arrebola *et al.* 2014).

At the beginning of differentiation h-ADMSCs expressed pluripotency genes OCT4, SOX2, NANOG. They are down-regulated with the ongoing process of differentiation. We observed faster down-regulation of NANOG as effects of PCB 153, in concentration 0.1 μM , diluted in fat vehicle. It may be a stimulus to differentiation to adipocyte and loss of pluripotency of mesenchymal stem cells under PCB 153 treatment.

FASN is highly expressed in lipogenic tissues such as adipose tissue, liver, lactating breast. It is a key enzyme in the *de novo* synthesis of long-chain fatty acids starting with acetyl coenzyme A and malonyl-coenzyme A using NADPH as a reducing factor. The observed lower levels of FASN expression in our study are determined because cells obtained their needed fatty acids from fat vehiculum, rather than from lipogenesis, as occurs in normal cells. FASN provides saturated lipids for membrane synthesis, increased saturated lipid content in the membranes. FASN expression and activities are up-regulated by androgens and epidermal growth factor. However, we were not able to show any additional effects to fat vehiculum, although PCB 153 shows a weak antiandrogenic effect. FASN has been implicated in diabetes and cancer development. It also can be overexpressed through an activation of the PI3K/Akt pathway.

LIPE catalyzes both the release of fatty acids from storage triglycerides in adipocytes and the liberation of cholesterol from cholesterol esters in steroidogenic tissues. LIPE activity is regulated in a tissue-, development- and hormone-specific fashion, the latter in large part by serine phosphorylation (Sztrolovics *et al.* 1997). Similarly to FASN, there was a down-regulation of LIPE after the treatment of fat vehiculum or fat vehiculum with PCB 153, with no differences between them.

PPAR γ , a member of the nuclear receptor superfamily of ligand activated transcription factors, represents one of the key regulatory elements taking part in proliferation of precursor's cells and their differentiation into mature adipocytes. Its activation by various ligands (such as fatty acids and eicosanoids) sets in the run the transcription process promoting adipocyte differentiation. The level of PPAR γ protein peaks soon after differentiation and remains high in mature adipocytes. Thus PPAR γ functions as a cellular sensor for nutritional fatty acids which, in mature adipocytes, is capable of transducing metabolic signals into the transcriptional control of genes involved in insulin

signaling, glucose and fatty acids metabolism. In response to energy overfeeding, the expression of PPAR γ rather than SREBP1 was closely associated with most adipogenic or lipogenic genes (Ji *et al.* 2014). In our study PPAR γ expression was significantly down-regulated in lipid vehicle and still more after exposure to PCB 153 in concentration 0.1 μ M. Consistent with our results *de novo* lipogenesis pathway has been demonstrated to be repressed in obese, insulin-resistant adipose tissue of both humans and rodents however with cytokine-mediated suppression of PPAR γ and SREBP1 (Zhang *et al.* 1996, Sewter *et al.* 2002, Tang *et al.* 2006, Ye 2008, Guilherme *et al.* 2009, Keuper *et al.* 2013). PPAR γ is required for activation of the lipolytic regulatory network, dysregulation of which is an important feature of obesity-induced insulin resistance in humans. Defective PPAR γ impairs catecholamine-induced lipolysis. This abnormal lipolytic response is exacerbated by a state of positive energy balance in leptin-deficient ob/ob mice (Rodriguez-Cuenca *et al.* 2012). Defective PPAR γ is associated with decreased basal expression of the lipase genes PNPLA2 (ATGL) and LIPE (HSL), and lipid droplet protein genes FSP27 and PLIN 2 *in vivo* and *in vitro*. Only few studies based on preadipocytes model have shown that PCBs, especially dioxin like PCBs as PCB 126 have potential by the way of AhR activation to inhibit PPAR γ transcription and subsequent adipogenesis (Gadupudi *et al.* 2015).

MiRNA and its host gene PPARGC1B are primary PPAR γ targets in adipocytes (John *et al.* 2012). MiRNA can induce lipogenesis and expression of lipogenic genes, when overexpressed during adipogenesis of mesenchymal precursors (Takada *et al.* 2009). PPARGC1B is a known transcriptional co-activator responsible for inducing the target genes of numerous transcription factors that are involved in regulation of lipogenesis and related processes (Lin *et al.* 2005, Ortega *et al.* 2010).

The Akt (protein kinase B) pathway is a signal transduction pathway that promotes the survival and growth in response to extracellular signals. Activated-phosphorylated Akt mediates downstream responses, including cell survival, growth, proliferation, cell migration and angiogenesis, by phosphorylating a range of intracellular proteins.

The pathway is highly regulated by multiple mechanisms, often involving cross-talk with other signaling pathways. Problems with PI3K-Akt pathway regulation have been linked to a range of diseases such as

cancer and T2DM. Akt phosphorylates as many as 100 different substrates, leading to a wide range of effects on the cell. For example increased insulin signaling at Akt signaling node may lead to reduced insulin sensitivity at endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling node (Kearney 2013). The extremes of insulin sensitivity both impact unfavourably on endothelial cell function. Our study showed an increased Akt level and decreased Phospho-Akt level, measured by Western blot, at day 21 of ongoing process of differentiation because of added lipid vehicle; however these changes were more profound after PCB 153 co-exposure, especially in 0.1 μ M and 1 μ M concentrations. Due to that fact the relation of Phospho-Akt to Akt was reduced once again especially in concentrations 0.1 and 1 μ M.

In conclusion, this study gives us a molecular insight of PCB 153 induced changes in gene expression with a special reference to differentiation process in the h-ADMSCs line which leads to the mature adipocytes. These changes are visible only in fat (nutrient toxic) environment and are associated especially with down-regulation of key master genes of adipogenesis and pAkt level. Dysfunctional adipocytes play a significant role in initiating insulin resistance. Preadipocytes make up a large portion of adipose tissue and are necessary for the generation of functional mature adipocytes through adipogenesis.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the NT 14330-3/2013 Polychlorinated persistent organic pollutants in the ethiopathogenesis of obesity and insulin resistance and by the Charles University Research Fund (project number Q39).

Abbreviations

ACLY – ATP citrate lyase, Akt – protein kinase B, DDE – dichlorodiphenyl dichloroethylene, eNOS – endothelial nitric oxide synthase, FASN – fatty acid synthase *de novo*, h-ADMSCs – human adipose-derived mesenchymal stem cells, LV – lipid vehicle (NuTRIflex), miRNA – micro-ribonucleic acid, NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NANOG – nanog homeobox, NHANES – National Health and Nutrition Examination Survey, INSR – insulin receptor, LIPE – hormone-sensitive lipase, OCT – octamer-binding

transcription factor 4, pAkt – phosphorylated Akt, PCBs – polychlorinated biphenyls, PCR – polymerase chain reaction, PI3K/AKT – phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway, PLIN2 – perilipin 2, PPAR γ – peroxisome proliferator-activated, receptor gamma, PPARGC1B – peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β , SOX2 – SRY-box 2, SREBP-1 – sterol regulatory element-binding protein-1, SV – lipid free vehicle- dimethylsulfoxid, T2DM – type 2 diabetes mellitus.

References

- ARREBOLA JP, OCANA-RIOLA R, ARREBOLA-MORENO AL, FERNANDEZ-RODRIGUEZ M, MARTIN-OLMEDO P, FERNANDEZ MF, OLEA N: Associations of accumulated exposure to persistent organic pollutants with serum lipids and obesity in an adult cohort from Southern Spain. *Environ Pollut* 195: 9-15, 2014.
- BENCKO V, SKULOVA Z, KRECMEHOVA M, LIEM AK: Selected polyhalogenated hydrocarbons in breast milk. *Toxicol Lett* 96-97: 341-345, 1998.
- BREIVIK K, SWEETMAN A, PACYNA JM, JONES KC: Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - a mass balance approach. 1. Global production and consumption. *Sci Total Environ* 290: 181-198, 2002.
- CAVE M, APPANA S, PATEL M, FALKNER KC, MCCLAIN CJ, BROCK G: Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003-2004. *Environ Health Perspect* 118: 1735-1742, 2010.
- CERNA M, MALY M, GRABIC R, BATARIOVA A, SMID J, BENES B: Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere* 72: 1124-1131, 2008.
- CERNA M, BENCKO V, BRABEC M, SMID J, KRASKOVA A, JECH L: Exposure assessment of breast-fed infants in the Czech Republic to indicator PCBs and selected chlorinated pesticides: area-related differences. *Chemosphere* 78: 160-168, 2010.
- GADUPUDI G, GOURRONC FA, LUDEWIG G, ROBERTSON LW, KLINGELHUTZ AJ: PCB126 inhibits adipogenesis of human preadipocytes. *Toxicol In Vitro* 29: 132-141, 2015.
- GOVARTS E, NIEUWENHUIJSEN M, SCHOETERS G, BALLESTER F, BLOEMEN K, DE BOER M, CHEVRIER C, EGGESBO M, GUXENS M, KRAMER U, LEGLER J, MARTINEZ D, PALKOVICOVA L, PATELAROU E, RANFT U, RAUTIO A, PETERSEN MS, SLAMA R, STIGUM H, TOFT G, TRNOVEC T, VANDENTORREN S, WEIHE P, KUPERUS NW, WILHELM M, WITTSIEPE J, BONDE JP: Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect* 120: 162-170, 2012.
- GUILHERME A, TESZ GJ, GUNTUR KV, CZECH MP: Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *J Biol Chem* 284: 17082-17091, 2009.
- HENNIG B, ETTINGER AS, JANDACEK RJ, KOO S, MCCLAIN C, SEIFRIED H, SILVERSTONE A, WATKINS B, SUK WA: Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environ Health Perspect* 115: 493-495, 2007.
- JI P, DRACKLEY JK, KHAN MJ, LOOR JJ: Overfeeding energy upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma-controlled adipogenic and lipolytic gene networks but does not affect proinflammatory markers in visceral and subcutaneous adipose depots of Holstein cows. *J Dairy Sci* 97: 3431-3440, 2014.
- JOHN E, WIENECKE-BALDACCHINO A, LIIVRAND M, HEINANIEMI M, CARLBERG C, SINKKONEN L: Dataset integration identifies transcriptional regulation of microRNA genes by PPARgamma in differentiating mouse 3T3-L1 adipocytes. *Nucleic Acids Res* 40: 4446-4460, 2012.
- KEARNEY MT: Changing the way we think about endothelial cell insulin sensitivity, nitric oxide, and the pathophysiology of type 2 diabetes: the FoxO is loose. *Diabetes* 62: 1386-1388, 2013.
- KEUPER M, WERNSTEDT ASTERHOLM I, SCHERER PE, WESTHOFF MA, MOLLER P, DEBATIN KM, STRAUSS G, WABITSCH M, FISCHER-POSOVSZKY P: TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) regulates adipocyte metabolism by caspase-mediated cleavage of PPARgamma. *Cell Death Dis* 4: e474, 2013.
- KOZERA B, RAPACZ M: Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54: 391-406, 2013.

- LEE DH, LEE IK, SONG K, STEFFES M, TOSCANO W, BAKER BA, JACOBS DR JR: A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* 29: 1638-1644, 2006.
- LEE DH, LEE IK, PORTA M, STEFFES M, JACOBS DR JR: Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetologia* 50: 1841-1851, 2007.
- LIN J, HANDSCHIN C, SPIEGELMAN BM: Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1: 361-370, 2005.
- MULLEROVA D, KOPECKY J: White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res* 56: 375-381, 2007.
- MULLEROVA DM, MATEJKOVA D, DVORAKOVA J, MULLER L, ROSMUS J: Persistent organochlorine pollutants in obese women after diet induced weight loss: five years follow up study. *Centr Eur J Public Health* 23: 214-217, 2015.
- MULLEROVA D, PESTA M, CEDIKOVA M, DVORAKOVA J, KULDA V, SRBECKA K, MULLER L, DVORAK P, KRIPNEROVA M, KRALICKOVA M, BABUSKA V, KUNCOVA J: DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *J Appl Biomed* 14: 113-117, 2016.
- NI Y, JI C, WANG B, QIU J, WANG J, GUO X: A Novel pro-adipogenesis factor abundant in adipose tissues and over-expressed in obesity acts upstream of PPAR γ and C/EBP α . *J Bioenerg Biomembr* 45: 219-228, 2013.
- ORTEGA FJ, MORENO-NAVARRETE JM, PARDO G, SABATER M, HUMMEL M, FERRER A, RODRIGUEZ-HERMOSA JI, RUIZ B, RICART W, PERAL B, FERNANDEZ-REAL JM: MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 5: e9022, 2010.
- PAVUK M, CERHAN JR, LYNCH CF, SCHECTER A, PETRIK J, CHOVANCOVA J, KOCAN A: Environmental exposure to PCBs and cancer incidence in eastern Slovakia. *Chemosphere* 54: 1509-1520, 2004.
- RODRIGUEZ-CUENCA S, CAROBIO S, VELAGAPUDI VR, BARBARROJA N, MORENO-NAVARRETE JM, TINAHONES FJ, FERNANDEZ-REAL JM, ORESIC M, VIDAL-PUIG A: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. *Mol Cell Biol* 32: 1555-1565, 2012.
- SEWTER C, BERGER D, CONSIDINE RV, MEDINA G, ROCHFORD J, CIARALDI T, HENRY R, DOHM L, FLIER JS, O'RAHILLY S, VIDAL-PUIG AJ: Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 51: 1035-1041, 2002.
- SZTROLOVICS R, WANG SP, LAPIERRE P, CHEN HS, ROBERT MF, MITCHELL GA: Hormone-sensitive lipase (Lipe): sequence analysis of the 129Sv mouse Lipe gene. *Mamm Genome* 8: 86-89, 1997.
- TAKADA I, KOUZMENKO AP, KATO S: Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets* 13: 593-603, 2009.
- TANG X, GUILHERME A, CHAKLADAR A, POWELKA AM, KONDA S, VIRBASIVS J, NICOLORO SM, STRAUBHAAR J, CZECH MP: An RNA interference-based screen identifies MAP4K4/NIK as a negative regulator of PPAR γ , adipogenesis, and insulin-responsive hexose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2087-2092, 2006.
- WAHLANG B, BEIER JI, CLAIR HB, BELLIS-JONES HJ, FALKNER KC, MCCLAIN CJ, CAVE MC: Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol Pathol* 41: 343-360, 2013.
- YE J: Regulation of PPAR γ function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 405-408, 2008.
- ZHANG B, BERGER J, HU E, SZALKOWSKI D, WHITE-CARRINGTON S, SPIEGELMAN BM, MOLLER DE: Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 10: 1457-1466, 1996.

PŘÍLOHA VI

PEŠTA, M., ČEDÍKOVÁ, M., DVOŘÁK, P., DVOŘÁKOVÁ, J., KULDA, V., SRBECKÁ, K., MÜLLER, L., BOUCHALOVÁ, V., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V., KUNCOVÁ, J. a D. MÜLLEROVÁ. Trends in gene expression changes during adipogenesis in human adipose derived mesenchymal stem cells under dichlorodiphenyldichloroethylene exposure. *Molecular & Cellular Toxicology* [online]. 2018 Oct 14(4):369-379. Dostupné z doi: 10.1007/s13273-018-0041-1.

Trends in gene expression changes during adipogenesis in human adipose derived mesenchymal stem cells under dichlorodiphenyldichloroethylene exposure

Martin Pesta^{1,2}, Miroslava Cedikova^{2,3}, Pavel Dvorak^{1,2}, Jana Dvorakova⁴, Vlastimil Kulda⁵, Kristyna Srbecka⁵, Ludek Muller⁶, Vendula Bouchalova⁴, Milena Kralickova^{2,7}, Vaclav Babuska⁵, Jitka Kuncova^{2,3} & Dana Mullerova⁴

Received: 22 January 2016 / Accepted: 7 December 2017

© The Korean Society of Toxicogenomics and Toxicoproteomics and Springer 2018

Abstract

Backgrounds: Exposure to lipophilic environmental pollutants has been explored as a risk factor of development of diabetes mellitus in obese. Adipose tissue is a reservoir of bioaccumulative lipophilic contaminants including p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE). Our aim was to analyze the effect of DDE (in concentrations 0.1 μM, 1 μM, and 10 μM) on adipocyte differentiation and insulin signalling pathway on *in vitro* adipogenic model of human adipose derived mesenchymal stem cells (hADMSC).

Methods: The effect of DDE was monitored by analysis of expression (RT qPCR, Western blotting) of genes involved in adipocyte differentiation and insulin signalling pathway including lipid metabolism on days 0, 4, 10, 21, 28 of differentiation.

Results: The main observation was significant increase of INSR, LIPE, FASN, SREBP1, OCT4 and AKT2

expression under influence of DDE. We did not record any increase of the active form of Akt.

Conclusion: Our findings suggest that DDE exposure changes the differentiation of adipocytes, enhances the lipid metabolism and so may play a role in the development of obesity and metabolic diseases by affecting the insulin signalling pathway. The influence of DDE seems to be similar to the effect of insulin itself. However, further studies to elucidate the mechanism of action of DDE are necessary.

Keywords: Adipocytes, Persistent organic pollutants, Dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE), Endocrine disruptor, Obesity

Introduction

Recently, the exposure to lipophilic environmental pollutants has been explored as a potential risk factor of obesity and metabolic diseases including type 2 diabetes. Epidemiological studies have revealed elevated serum concentrations of certain persistent organic pollutants (POPs), including the p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), are associated with higher prevalence of type 2 diabetes¹. At present, DDE, the metabolite of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), and hexachlorobenzene, are still highly widespread in the environment and in the food chain².

In the human body, the adipose tissue is a reservoir of lipophilic POPs. It is suggested that DDE, as other organochlorine pesticides, may crossroad or modulate the effect of endogenous ligands of nuclear transcription factors, participating in the differentiation, metab-

¹Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

³Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

⁴Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

⁵Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

⁶Department of Cybernetics, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Czech Republic

⁷Department of Histology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Czech Republic

Correspondence and requests for materials should be addressed to V. Kulda (✉) vlastimil.kulda@lfp.cuni.cz

olism and the secretory function of adipocytes. These mechanisms include most importantly endocrine disrupting potency of POP mixtures on androgen, estrogen or thyroid hormone metabolism/functions in the white adipose tissue³. DDE has been demonstrated to be an androgen receptor antagonist⁴ and glucocorticoid receptor antagonist⁵. Indeed, the specific mechanism of DDE action is just beginning to be elucidated.

Mesenchymal stem cell pluripotency and differentiation to adipocytes are controlled by a complex network of transcription factors⁶. First we monitored the ongoing process of differentiation and the effect of DDE on it by an analysis of expression of genes playing roles during development of mature adipocyte from mesenchymal stem cells. We analyzed the expression of genes keeping cells in pluripotent state – OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), NANOG (nanog homeobox) and SOX2 (SRY-box 2), and genes directing differentiation into adipocytes – PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) and PPARGC1B (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta). Homeodomain transcription factors OCT4, SOX2 and NANOG have been recognised as key transcriptional regulators not only in embryogenesis but in somatic stem cells as well^{7,8}. NANOG, SOX2 and OCT4 closely interact with each other and share target genes^{9,10}. OCT4 and SOX2 have been shown to form a heterodimeric transcription complex¹¹⁻¹³. NANOG seems to stabilise the pluripotent state¹⁴. Jak/Stat3 and Akt/PI3K signalling pathways play an important role in regulation of the activity of SOX2 and OCT4^{15,16}.

PPAR γ is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand activated transcription factors. It is highly expressed in adipose tissue. PPAR γ is a transcription factor which plays a central role in the differentiation and maturation of adipocytes^{17,18}.

Pro-adipogenic transcription factors (e.g. CCAAT/enhancer-binding proteins) promote adipogenesis in part via regulation of PPAR γ expression or by stimulating PPAR γ transcriptional activity¹⁹. PPAR γ heterodimerizes with the retinoid X receptor (RXR) and binds to PPAR responsive element (PPRE) in the regulatory region of the target genes²⁰ and so it has an influence on such processes as lipid metabolism²¹, glucocorticoid signalling²², insulin signalling²³, as well as cAMP levels²⁴.

PPARGC1B mRNA is induced during white and brown adipocyte differentiation²⁵. PPARGC1B regulates mitochondrial oxidative metabolism. It is highly responsive to environmental cues and coordinates metabolic gene programs through interaction with transcription factors and chromatin-remodeling proteins²⁶.

Uncoupling protein 3 (UCP3) is a member of mi-

tochondrial uncoupling proteins, that increase proton leak across the inner mitochondrial membrane. While UCP1 is exclusively expressed in brown adipose tissue and has a role in non-shivering thermogenesis, UCP3 is expressed primarily in muscle and in both white and brown adipose tissue²⁷. The function of UCP3 is just being elucidated, UCP3 was proposed to modulate the respiratory chain, transport fatty acids and to have protective role against triglyceride accumulation²⁸.

Furthermore, we have monitored the DDE effect on insulin receptor pathway and lipid metabolism in relation to insulin resistance, by the assessment of the expression of genes: insulin receptor (INSR), homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (AKT2), sterol regulatory element-binding protein (SREBP-1), ATP citrate lyase (ACLY), hormone-sensitive lipase (LIPE) and fatty acid synthase (FASN). INSR is a plasma membrane-resident glycoprotein with the tyrosine kinase activity through which the actions of insulin are mediated. As a receptor tyrosine kinase, activated INSR phosphorylates sites in its carboxy-terminal regions, which, serve as recruitment sites for the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)²⁹, which, on activation, leads to the activation of Akt. SREBP-1 is an important transcriptional factor that controls lipogenesis and the lipid uptake³⁰.

Lipids which serve as a main storage of energy are neutral fats, chemically triacylglycerols, esters of glycerol and fatty acids. FASN, which catalyses *de novo* synthesis of fatty acids, can modulate the expression of genes involved in pathogenesis of metabolic diseases³¹. The transcription of FASN gene can be activated by stimulatory factors acting through SREBP-1 mentioned above³².

ACLY is an enzyme responsible for the formation of cytosolic acetyl-CoA. Acetyl-CoA is formed from saccharides in mitochondria and for the biosynthesis of fatty acids it must be transported in to cytosol. So, ACLY is a cross-link between glucose metabolism and fatty acid synthesis. One of the ways of ACLY activity regulation is via phosphorylation by insulin signalling³³.

LIPE is gene coding hormone sensitive lipase (HSL), enzyme activated by Gas/cAMP/PKA/HSL signalling responsible for the cleavage of fatty acids from triglycerides³⁴. The linking molecule governing expression of LIPE, ACLY, FASN and PPAR γ is the transcription factor SREBP1.

We addressed the question of whether the presence of DDE in the cultivation medium during the differentiation of progenitor cells into adipocytes, could cause insulin resistance by influencing the insulin receptor pathway and subsequently, changing the gene expression of enzymes and regulatory molecules of lipid metabolism.

Materials & Methods

To examine the effect of DDE on adipocyte differentiation and metabolism, we prepared an *in vitro* model of adipocytes from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (hADMSC), where cells were grown either as controls (cultivation in differentiation medium alone or in differentiation medium enriched by lipids) or DDE exposed (cultivation in differentiation medium enriched by lipids containing DDE in one of three concentrations: 0.1 μM , 1 μM , and 10 μM). The concentrations of DDE were chosen to reflect the levels measured in human serum or adipose tissue³⁵, therefore may have biological relevance. Real-time PCR was used to analyze the potential changes in the expression of selected genes under the influence of DDE. The assessed genes, sequences of primers and corresponding UPL (Universal Probe Library) probes are listed in Table 1.

Cell culture, differentiation and DDE treatment

Human adipose-derived stem cells (hADMSCs) from Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) were cultivated in 6-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) in the commercially available culture medium MesenPRO RSTM Medium supplemented with MesenPRO RSTM Growth Supplement with reduced serum level (2%), 1% L-glutamine and 1% Gentamicin (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) as we described previously³⁶.

The differentiation into adipocytes was performed by StemPro[®] adipogenesis differentiation kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol. The cells were seeded with a total number of 1×10^5 cells in a 6-well cell culture plate. The medium was changed every 3 days up to a total incubation time of 28 days.

The cultures were exposed to DDE (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 28 consecutive days from the start of the experiment until the full differentiation. DDE was administered in lipid vehicle (lipid fraction of NuTRiflex[®] Lipid peri (B. Braun, Melsungen, Germany) in three different concentrations (0.1 μM , 1 μM , and 10 μM). Lipid vehicle contained medium chain triglycerides (100 g/L) and soya bean oil (100 g/L). The concentration of the lipid vehicle in differentiation medium was 0.2% (v/v). The control cultures received the differentiation medium alone or with the lipid vehicle without DDE. The cell samples for quantitative estimation of mRNA were taken on days 0, 4, 10, 21 and 28 of the course of differentiation. All experiments were done in biological triplicates.

Quantitative estimation of mRNA of selected genes using RT real-time PCR

A quantitative estimation of mRNA of selected genes was performed by RT real-time PCR method with UPL probes (Universal Probe Library, Roche). The total RNA was isolated from a pellet of cells (approximately 10^5 cells) by FastRNAPro Green Kit (QBIogene, Irvine, CA, USA). A reverse transcription (RT) was performed from 250 ng of the total RNA with Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers as primers. The sequences of primers and corresponding UPL probes (Table 1) were generated by ProbeFinder Software (Roche, Mannheim, Germany) as we published previously³⁷. The primers were synthesized by East Port Praha (Praha, Czech Republic). The quantitative estimation was performed in technical duplicates on Stratagene Mx3005P apparatus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All samples were also assessed for the expression of reference genes β -glucuronidase (GUSB), hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ). The results are presented as normalized values ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ algorithm) using the geometric mean of quantifications (C_t) of the three reference genes.

Determination of p-Akt/Akt by Western blot

On days 4 and 21, cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Switzerland) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Switzerland). The protein was quantified using PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 3 μg aliquots of protein were electrophoresed by SDS-PAGE and transferred onto Immun-Blot PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Protein levels of Akt and p-Akt were determined by PhosphoPlus Akt (Ser473) Antibody Duet kit (Cell Signalling Technologies, Danvers, MA, USA) containing primary antibodies Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP[®] Rabbit mAb (used in 1:2000 dilution) and Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (used in 1:1000 dilution). Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (1:10000 dilution; Cell Signalling Technologies, Danvers, MA, USA) was used as a secondary antibody. For the purposes of internal control and relative quantification, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was detected by GAPDH (14C10) Rabbit mAb (1:1000 dilution; Cell Signalling Technologies, Danvers, MA, USA).

Table 1. Primer sequences for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) with Universal Probe Library probes.

Symbol	Gene name	Function	Primer sequence 5'-3'	UPL probe
Reference genes				
GUSB	β -glucuronidase	Lysosomal breakdown of glycosaminoglycans	CGCCCTGCCATCTGTATTC TCCCACAGGGAGGTGTAG	57
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	Purine salvage pathway	TGACCTTGATTTATTTGCATACC CGAGCAAGAGGTTTCAAGTCCCT	73
YWHAZ	14-3-3 protein zeta	Signal transduction regulating adaptor	GCAATTAAGAGAGACAACCTTGACA TGGAGGCCGGTTAATTTT	2
Monitoring of differentiation				
Oct	Octamer-binding transcription factor 4	Homeodomain transcription factor involved in the self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells	AGCAAAACCCGGGAGGT CCACATCGGCTGTGTATATC	35
NANOG	Nano-g homeobox	Transcription factor involved in the self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells	ATGCTCACACGGAGACTGT AAGTGGTGTGTTGCCCTTTG	31
SOX2	SRY-box 2	Transcription factor essential for maintaining pluripotency of undifferentiated embryonic stem cells	TTGCTGCCCTTTAAAGACTAGGA CTGGGGCTCAAACTTCTCTC	35
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ	Regulation of fatty acid storage and glucose metabolism	GACAGAAAGACAACAACAATC GGGGTGTATGTTTGAACCTTG	7
PPARGC1B	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	Stimulator of some transcription factors and nuclear receptors activities	GGCAGGCCTCA GATCTA AAA TCATGGGAGCCCTTCTTCT	56
PLIN2	Perilipin 2, ADRP	Surface protein of intracellular lipid storage droplets	TCAGCTCCATTTCTAGTTGCACC CCTGAATTTTCTGATTTGGCACT	72
Adipocyte metabolism and its regulation				
INSR	Insulin receptor	Receptor tyrosine kinase which mediates the actions of insulin	GCTGGATATTGCCTCAAAGG TGAGAAATTTCA GACTCGAATGG	54
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	Serine/threonine-protein kinases of signal transduction which regulate metabolism, proliferation, cell survival, growth and angiogenesis	CTCACACAGTCAACCGAGAGC TGGGTCTGGAAGGCATACTT	65
FASN	Fatty acid synthase	Multifunctional protein of fatty acids synthesis	CAGGCACACACGATGGAC CGGAGTGAATCTGGGTTGAT	11
SREBP-1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein	Transcription factor binding to the sterol regulatory element-1	CGCTCTCCATCAATGACA TGGCCAAGACAGCAGAITTA	77
ACLY	ATP citrate lyase	Synthesis of cytosolic acetyl-CoA needed for lipid synthesis	CGGACTTCGGCAGAGGTTAG TGCTCTGAAATTCGCTTGG	46
LIPE	Homo ne-sensitive lipase	Hydrolysis of triglycerides	CGCTGGAGGAGTGTCTT TTCGTTCCCTGTTGAGC	3
UCP3	Uncoupling protein 3	Separation of oxidative phosphorylation from ATP synthesis	ATGGACGCCTACAGAACCAAT ATGATGTTGGGCAAAAGTTCC	12

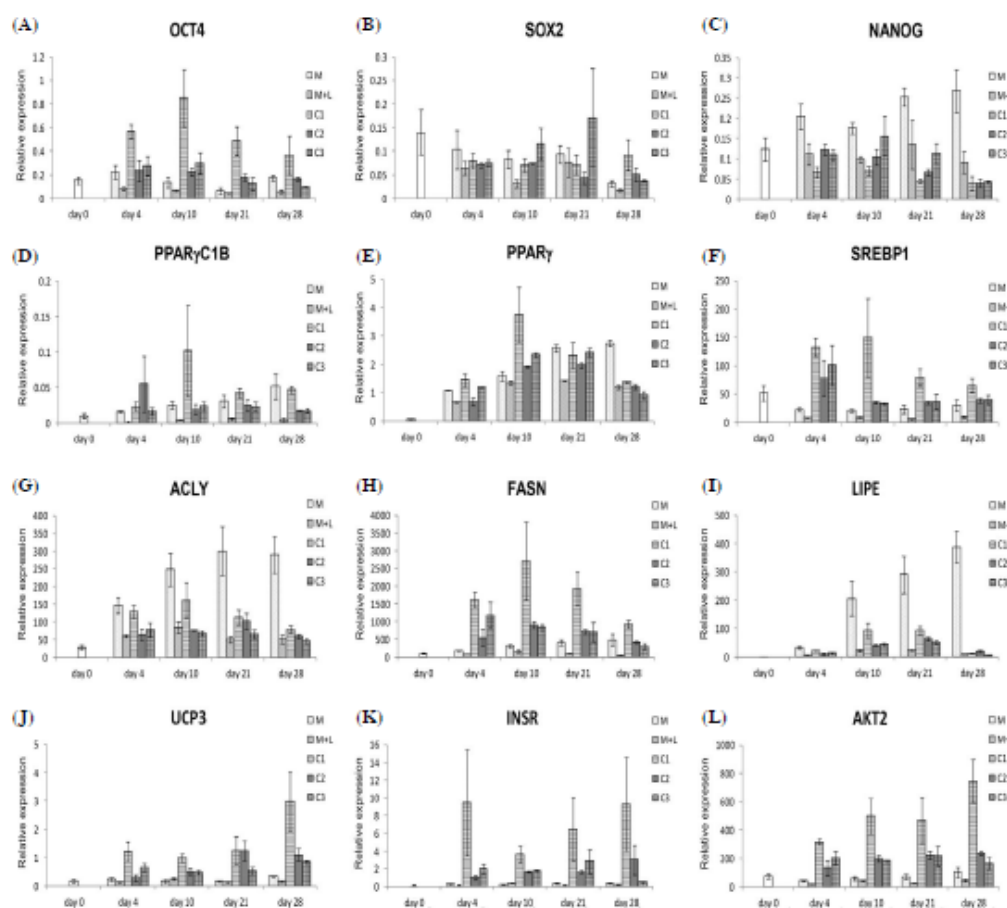


Figure 1. The changes of gene expression during the course of differentiation (day 0, day 4, day 10, day 21, day 28) of hADMSC into adipocytes caused by presence of DDE. The differentiating cells were cultivated in differentiation medium (M), differentiation medium supplemented with lipid vehiculum (M+L) and differentiation medium supplemented with lipid vehiculum containing DDE at 3 different concentrations: DDE at concentration 0.1 μ M (C1), 1 μ M (C2), 10 μ M (C3). The relative expression values shown are the mean \pm standard error of the mean (SEM). (A-D) Alteration of the expression of genes involved in keeping pluripotent state and differentiation (OCT4, SOX2, NANOG, PPAR γ C1B). (E) Increase of expression of the adipogenesis regulator PPAR γ till day 21 of the course of differentiation caused by DDE. (F-J) Increase of expression of genes involved in adipocyte lipid metabolism (SREBP1, ACLY, FASN, LIPE, UCP3) caused by DDE. (K-L) Increase of expression of members of insulin signalling pathway (INSR, AKT2) caused by DDE.

The immune complexes were visualized using West-embBright ECL HRP substrate (Advanta, Menlo Park, CA, USA), the luminescent signal was detected and the relative band intensity was analyzed by a digital documentation system and software Alliance 4.7 (UVitec, Cambridge, UK).

Statistical analysis

All experiments were done in biological triplicates. Gene expression analysis using RT qPCR was done in technical duplicates. A non-parametric Wilcoxon two-sided signed-rank test was used for statistical comparisons of gene expression data. The values in

graphs are presented as the mean \pm standard error of the mean. The differences were considered statistically significant if $P < 0.05$.

Results

The effect of DDE on the alteration of the expression of genes involved in keeping pluripotent state and differentiation

On the days of measurement, during the course of the 28 days of differentiation of hADMSC to adipocytes, we observed a statistically significant decrease in OCT4, NANOG, SOX2 and PPAR γ C1B expression in cells cultivated in standard differentiation medium enriched by lipids in comparison to those cultivated in standard differentiation medium alone. The results are summarised in Figure 1.

The cultivation in medium containing DDE significantly increased the expression of OCT4 and PPAR γ C1B. This effect was observed on each of the days when samples were taken. The results showing the effect of DDE on NANOG proved not to be homogenous; however, there was an obvious decrease in NANOG expression on day 28 of the experiment. DDE in concentrations 10 μ M and 1 μ M caused a significant increase of SOX2 expression. Based on our comparison of the levels of differentiation markers, we determined that the presence of lipids in the cultivation medium foreshortened the period they spent in a pluripotent state, while cells under the influence of DDE showed a tendency to maintain their pluripotent characteristics for longer.

The effect of DDE on the alteration of the expression of the main regulator of adipogenesis PPAR γ

During the course in differentiation medium alone, we observed the increase of PPAR γ expression. We measured a statistically significant decrease in expression of PPAR γ in standard differentiation medium enriched by lipids compared to standard differentiation medium alone. A significant increase in PPAR γ expression till day 21 of the course of differentiation was caused by the presence of DDE. On day 28, in time of fully differentiated adipocytes, we observed decrease in expression of PPAR γ in cell cultures exposed to lipids.

The effect of DDE on the alteration of the expression of genes coding enzymes involved in adipocyte lipid metabolism

We observed a statistically significant decrease in expression of ACLY, FASN, LIPE, SREBP1 in standard differentiation medium enriched by lipids in compar-

ison to standard differentiation medium alone. The cultivation in medium containing DDE significantly increased the expression of FASN, LIPE and SREBP1; regarding ACLY expression, this effect was only significant in concentrations 0.1 μ M and 1 μ M. When evaluating the effect of DDE on metabolism, we have to discern the effects of the presence of lipids and that of DDE as such. While ACLY and LIPE undeniably decrease their expression in the presence of lipids, and DDE only slightly, though significantly, diminishes this effect; the expression of FASN, SREBP1 and UCP3 is predominantly influenced by DDE, more markedly in lower DDE concentrations (1 μ M and 10 μ M).

The effect of DDE on the alteration of expression of members of insulin signalling pathway

We found a statistically significant decrease of AKT2 expression in standard differentiation medium enriched by lipids in comparison to standard differentiation medium alone. The cultivation in medium containing DDE caused a significant increase of INSR and AKT2 expression. Figure 2 illustrates the link of insulin signalling pathway to adipogenesis and lipid metabolism and changes under DDE exposure.

The effect of DDE on the alteration of Akt activity as a response to the stimulation of insulin receptor

The active form of Akt was assessed as the ratio of phosphorylated Akt and total Akt protein and also as

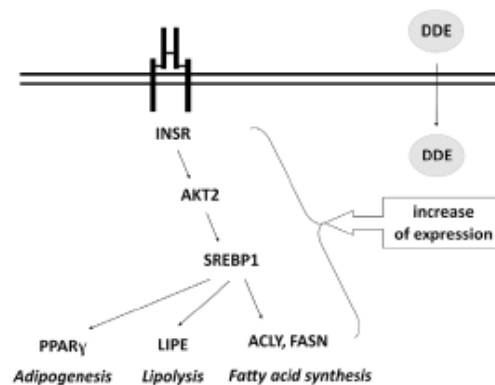


Figure 2. The link of insulin signalling pathway to adipogenesis and lipid metabolism. Under DDE exposure, we observed increase of expression of genes involved in insulin signalling pathway (INSR, AKT2, SREBP1) and genes whose expression is regulated by transcription factor SREBP1 (PPAR γ , LIPE, ACLY, FASN).

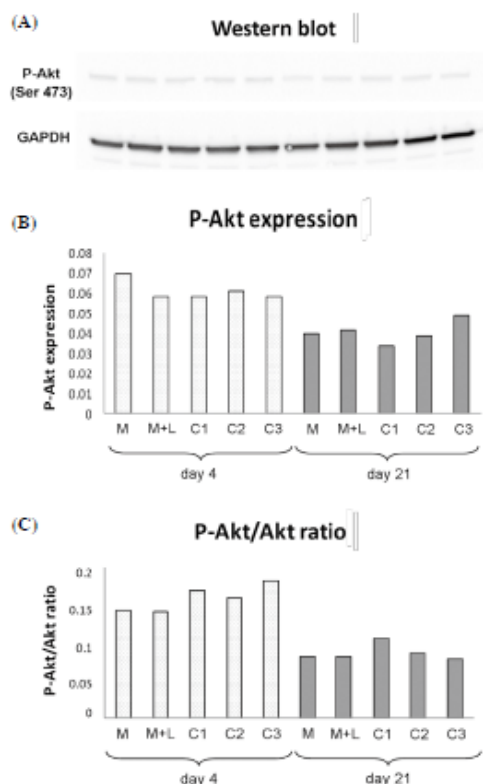


Figure 3. The effect of DDE exposure on Akt activity (phospho-Akt, Ser473) during the course of differentiation (day 4, day 21) of hADMSC into adipocytes. The differentiating cells were cultivated in differentiation medium (M), differentiation medium supplemented with lipid vehiculum (M+L) and differentiation medium supplemented with lipid vehiculum containing DDE at 3 different concentrations: DDE at concentration 0.1 μ M (C1), 1 μ M (C2), 10 μ M (C3). (A) Western blot images. (B) Quantitation of phospho-Akt (the ratio phosphorylated Akt and GAPDH protein). (C) The ratio of phosphorylated Akt and total Akt protein. In the presence of DDE, there was only a slight increase in activity of Akt (10% in average).

the ratio phosphorylated Akt and GAPDH protein. Neither on day 4 nor on day 21 of the experiment, we recorded changes in the activity of Akt under the influence of lipids in the cultivation medium. Comparing Akt activity on day 4 of the course of differentiation, we found that cells cultivated in the presence of pollutants showed higher activity of Akt by only 20% in average (Figure 3C).

There was a global decrease of Akt activity on day

21 compared to day 4. Comparing Akt activity on day 21 of the course of differentiation, we found that cells cultivated in the presence of pollutants showed only a slight increase in activity of Akt (10% in average), shown in Figure 3C.

The summary of DDE effect on adipogenesis and gene expression changes

Changes in morphology of the cells and corresponding changes of gene expression during the course of differentiation from hADMSC into adipocytes are shown in Figure 4.

Discussion

DDE is known to be an environmental bioaccumulative contaminant with an affinity to adipose tissue. Our aim was to evaluate the effects of exposure to DDE on the process of differentiation of hADMSC to adipocytes. We monitored DDE's effect on the insulin receptor pathway and lipid metabolism in the relation to insulin resistance by analyzing gene expression changes of genes involved in the insulin signalling pathway and lipogenesis.

First we monitored the expression of the core transcription factors in the control of pluripotency (NANOG, OCT4 and SOX2) in order to evaluate the effect of DDE on the course of differentiation. The cultivation in medium containing DDE significantly increased the expression of OCT4. In this regard, DDE contained in differentiation medium causes a change in the differentiation programme. The same holds true for the SOX2 gene. Taken together, we think that DDE prolongs pluripotent features. In relation to the above, the work of other authors shows a proliferative effect of DDE on preadipocytes³⁸, and also other cells³⁹. PPAR γ C1B is a member of the PGC-1 family of multifunctional transcriptional coregulators that act as 'molecular switches' in many metabolic pathways. PPAR γ C1B robustly regulates mitochondrial oxidative metabolism. Uldry *et al.* have observed PGC-1b mRNA is induced during white and brown adipocyte differentiation²⁵. Our results seem to indicate this as well, the cultivation in differentiation medium causes increase of PPAR γ C1B during the course of differentiation. We measured a more distinct increase in PPAR γ C1B expression during differentiation under the influence of DDE. We would like to mention that during the differentiation, we performed cell morphology documentation. Cells cultivated under the influence of DDE visually seemed more prosperous and differentiating. This observation is consistent with the results of the work of Mangum *et al.* however,

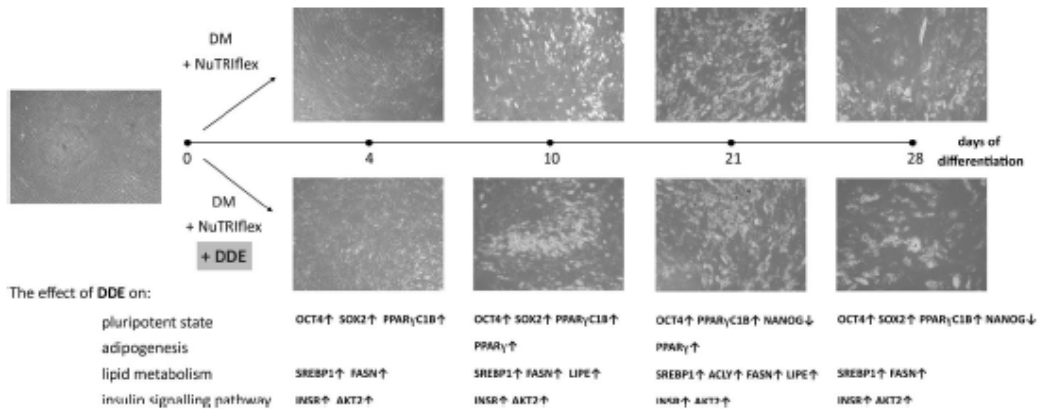


Figure 4. The effect of DDE exposure on differentiation of hADMSC into adipocytes. Micrographs show formation of lipid vacuoles during the course of differentiation. Differentiated adipocytes full of numerous lipid vacuoles are present from day 21. Corresponding changes of gene expression are summarized. DDE showed a tendency to keep pluripotent characteristics for longer. Under DDE exposure, there was an increase of expression of genes of lipid metabolism and insulin signalling pathway.

carried out on other cell lines (3T3-L1)⁴⁰.

The main objective of our work was to investigate DDE's effect on the insulin receptor pathway and lipid metabolism. Recently, it has been revealed that obesity-associated hyperinsulinemia drives adipose tissue inflammation, which in turn contributes to factors that suppress insulin-stimulated adipocyte de novo lipogenesis and systemic insulin sensitivity⁴¹. We found the results pertaining to the relationship between insulin receptor expression and AKT2 as well as its actual active (phosphorylated) form to be of particular interest. We measured a marked rise in expression of the insulin receptor and AKT2 in the presence of DDE, most notably in the differentiation medium with the lowest DDE concentration. Here, we would like to point out that the insulin concentration during the cultivation was higher than the physiological norm, the cells were under permanent insulin stimulation. Thus, under these conditions, the cells should not respond by increasing the expression INSR. While during cultivation in the differential medium and in differential medium supplemented with lipids is INSR expression relatively low, exposure to DDE caused a marked increase. Therefore, an increase in expression of insulin receptor must be related to the effects of DDE.

However, under the influence of DDE, the activation of insulin receptors caused only a slight increase of the active form of Akt (results of Western blot). This observation could be one the hints how presence of DDE causes insulin resistance.

Our results show that the cultivation in lipid-rich medium decreases the levels of the SREBP1 transcrip-

tion factor, which regulates the expression of FASN. And in fact, we did note a decrease of FASN expression. DDE radically alters this effect, as its presence causes overexpression of FASN despite the fact that fatty acid synthesis is unnecessary in a lipid-rich medium. In this sense, DDE stimulates fatty acid synthesis.

Although we did not registered a significant increase in the active form of Akt, we measured an increase in the expression of genes involved in lipogenesis (SREBP1, ACLY, FASN), an effect attributed to insulin. This hints to a different mechanism of upregulation of these genes than that mediated by Akt. One of the ways which could contribute to this upregulation can be the previously described inhibition of glucocorticoid nuclear receptor transcriptional activity to 72.5% by DDE⁵.

Similarly, as in the case of genes partaking of lipogenesis, DDE diluted in the differentiation medium caused an increase in expression of LIPE, a gene connected with lipid metabolism. The presence of the lipids in the differentiation medium decreased LIPE expression compared to its expression in cells cultivate in the differentiation medium alone; DDE diminished this effect. Based on our analysis of gene expression of genes concerned in lipid metabolism, we surmise that DDE in the presence of lipids, unexpectedly, stimulates lipid synthesis. Interesting finding is an increase of UCP3 expression under DDE influence which may be caused by overproduction of lipids in the cells due to DDE exposure. It is consistent with recent view on function of UCP3 which is supposed to protect against triglyceride accumulation²⁸.

PPAR γ is a lipid activated transcription factor regulating genes involved in terminal adipocyte differentiation and lipid metabolism⁴². Similarly as it has been published, we observed gradual increase in expression over the time of differentiation. PPAR γ regulates transcription activity of genes responsible for adipogenesis and lipid metabolism including FASN⁴². In our model, the cells under the influence of DDE increase the expression of PPAR γ , and it also probably contributes to the observed increase in expression of FASN. In time of fully differentiated adipocytes, we observed decrease in expression of PPAR γ in cell cultures exposed to lipids. Moreover, on day 10 and 21, there was significant increase of PPAR γ under the influence of DDE. We hypothesize that one of the effects of DDE is a change of differentiation to adipocytes in regards of faster attainment of adipocyte features.

Based on the assessment of the expression of genes involved in lipid synthesis and its regulation, the influence of DDE on differentiating adipocytes seems to be similar to the effect of insulin itself, among other things increase of lipid synthesis. It would thus be hypothesized that DDE mobilizes metabolism like insulin, and therefore, the natural regulation of metabolism by insulin may not achieve the correct response. If an organism wants to achieve an adequate response, it is possible either by increased insulin levels or by increasing the insulin sensitivity.

We think that this hypothesis is consistent with the results of the epidemiologic study of Tang-Péronard *et al.* published in 2015. High prenatal POP exposure (including DDE) was associated with high insulin levels in 5-year-old girls⁴³.

In the context of the foregoing, an interesting result was published by Howell *et al.*, who found that sub-acute exposition of mice to DDE caused hyperglycemia, which had not been caused by insulin resistance⁴⁴. The same authors states that chronic DDE exposure despite initial hyperglycemia leads to the normalization of glycemia. This normalization of fasting glucose levels appears to be a product of the increased insulin sensitivity, increased glucose disposal possibly mediated by the normalization of skeletal muscle Glut4 protein levels, and a decreased hepatic glucose production as indicated by the decreased expression of gluconeogenic genes⁴⁵.

Arrebola *et al.* in a cohort of women with a history of gestational diabetes mellitus found association between DDE and 2-h immunoreactive insulin⁴⁶. In our model cell lines, we observed under the influence of DDE overexpression of enzymes leading to the synthesis of fatty acids. At the level of the whole organism, Michele La Merrill *et al.* described after perinatal exposure of mice to the pesticide DDT increase in body fat in female offspring. Female offspring perinatally

exposed to DDT developed glucose intolerance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, and altered bile acid metabolism⁴⁷.

Kim *et al.* in 2016 published results of a study on the effect of DDT and DDE on adipocyte differentiation and lipid metabolism. In contrary to our study, they used 3T3-L1 cell line as a model of adipocytes and they administered DDE in dimethyl sulfoxide (DMSO). These authors analyzed the expression of PPAR γ , FASN, ACLY and LIPE and similarly as us observed higher expression of these genes in the cells treated by DDE⁴⁸.

Pestana *et al.* in 2017 described the effects of DDE exposure on Wistar rats. They concluded DDE exposure contributes to metabolic syndrome evolution and dysmetabolic obesity⁴⁹.

Conclusion

Our findings suggest that DDE exposure changes the differentiation of adipocytes, enhances the lipid metabolism and so may play a role in the development of obesity and metabolic diseases by affecting the insulin signaling pathway. However, further studies to elucidate more deeply the mechanism of action of DDE and especially to identify the direct targets of DDE are necessary.

Acknowledgements The study was supported by the grant of Ministry of Health of the Czech Republic NT14330-3/2013 Polychlorinated persistent organic pollutants in the etiopathogenesis of obesity and insulin resistance and by the Charles University Research Fund (project number Q39).

Conflict of Interest Martin Pesta, Miroslava Cedikova, Pavel Dvorak, Jana Dvorakova, Vlastimil Kulda, Kristyna Srbecka, Ludek Muller, Vendula Bouchalova, Milena Kralickova, Vaclav Babuska, Jitka Kuncova & Dana Mullerova declare that they have no conflict of interest.

Human and animal rights The article does not contain any studies with human and animal and this study was performed following institutional and national guidelines.

References

1. Taylor, K. W. *et al.* Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environ Health Perspect* **121**, 774–783 (2013).
2. Smeds, A. & Saukko, P. Identification and quantification of polychlorinated biphenyls and some endocrine

- disrupting pesticides in human adipose tissue from Finland. *Chemosphere* 44, 1463-1471 (2001).
3. Müllerova, D. *et al.* Negative association between plasma levels of adiponectin and polychlorinated biphenyl 153 in obese women under non-energy-restrictive regime. *Int J Obes* 32, 1875-1878 (2008).
 4. Kelce, W. R. *et al.* Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375, 581-585 (1995).
 5. Wilson, J. *et al.* Do persistent organic pollutants interact with the stress response? Individual compounds, and their mixtures, interaction with the glucocorticoid receptor. *Toxicol Lett* 241, 121-132 (2016).
 6. Ng, H.-H. & Surani, M. A. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol* 13, 490-496 (2011).
 7. Silva, J., Chambers, I., Pollard, S. & Smith, A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* 441, 997-1001 (2006).
 8. Lengner, C. J., Welstead, G. G. & Jaenisch, R. The pluripotency regulator Oct4, a role in somatic stem cells? *Cell Cycle Georget Tex* 7, 725-728 (2008).
 9. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956 (2005).
 10. Loh, Y.-H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-440 (2006).
 11. Botquin, V. *et al.* New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* 12, 2073-2090 (1998).
 12. Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A. & Muramatsu, M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 19, 5453-5465 (1999).
 13. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey, L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9, 2635-2645 (1995).
 14. Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234 (2007).
 15. Tang, Y. *et al.* Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation. *Stem Cells Dayt Ohio* 30, 2645-2656 (2012).
 16. Ormsbee Golden, B. D., Wuebben, E. L. & Rizzino, A. Sox2 expression is regulated by a negative feedback loop in embryonic stem cells that involves AKT signaling and FoxO1. *PLoS One* 8, e76345 (2013).
 17. Rosen, E. D. *et al.* C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16, 22-26 (2002).
 18. Choi, E.-K. *et al.* Coix seed extract attenuates the high-fat induced mouse obesity via PPAR γ and C/EBP α a downregulation. *Mol Cell Toxicol* 11, 213-221 (2015).
 19. Lee, J.-E. & Ge, K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell Biosci* 4, 29 (2014).
 20. Tontonoz, P. *et al.* Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 22, 5628-5634 (1994).
 21. Kishida, K. *et al.* Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 276, 48572-48579 (2001).
 22. MacDougald, O. A., Cornelius, P., Lin, F. T., Chen, S. S. & Lane, M. D. Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem* 269, 19041-19047 (1994).
 23. Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L., Groblewski, G. E. & MacDougald, O. A. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Correlation with GLUT4 gene expression. *J Biol Chem* 272, 25913-25919 (1997).
 24. Tang, Q. Q., Jiang, M. S. & Lane, M. D. Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 4855-4865 (1999).
 25. Udry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3, 333-341 (2006).
 26. Liu, C. & Lin, J. D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin* 43, 248-257 (2011).
 27. Boss, O. *et al.* Uncoupling protein-3, a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408, 39-42 (1997).
 28. Hilse, K. E. *et al.* The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1857, 72-78 (2016).
 29. Myers, M. G. *et al.* IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10350-10354 (1992).
 30. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131 (2002).
 31. Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Ortega, F. J. & Fernandez-Real, J. M. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clin Chem* 55, 425-438 (2009).
 32. Latasa, M. J., Moon, Y. S., Kim, K. H. & Sul, H. S. Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10619-10624 (2000).
 33. Chypre, M., Zaidi, N. & Smans, K. ATP-citrate lyase: A mini-review. *Biochem. Biophys Res Commun* 422, 1-4 (2012).

34. Carmen, G.-Y. & Víctor, S.-M. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18, 401-408 (2006).
35. Dirinck, E. L. *et al.* Exposure to persistent organic pollutants: relationship with abnormal glucose metabolism and visceral adiposity. *Diabetes Care* 37, 1951-1958 (2014).
36. Müllerová, D. *et al.* DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *J Appl Biomed* 14, 113-117 (2016).
37. Mullerova, D. *et al.* Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiol Res* 66, 653-662 (2017).
38. Chapados, N. A. *et al.* Increased proliferative effect of organochlorine compounds on human preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 365, 275-278 (2012).
39. Aubé, M., Larochelle, C. & Ayotte, P. Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environ Res* 111, 337-347 (2011).
40. Mangum, L. H., Howell, G. E. & Chambers, J. E. Exposure to p,p'-DDE enhances differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a model of sub-optimal differentiation. *Toxicol Lett* 238, 65-71 (2015).
41. Pedersen, D. J. *et al.* A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab* 4, 507-518 (2015).
42. Watanabe, M. *et al.* Regulation of PPAR gamma transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 429-436 (2003).
43. Tang-Péronard, J. L. *et al.* Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls. *Environ Res* 142, 407-413 (2015).
44. Howell, G. E. *et al.* Exposure to p,p'-dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) induces fasting hyperglycemia without insulin resistance in male C57BL/6H mice. *Toxicology* 320, 6-14 (2014).
45. Howell, G. E., Mulligan, C., Meek, E. & Chambers, J. E. Effect of chronic p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. *Toxicology* 328, 112-122 (2015).
46. Arrebola, J. P. *et al.* Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and markers of insulin resistance in a cohort of women with a history of gestational diabetes mellitus. *Environ Res* 136, 435-440 (2015).
47. La Merrill, M. *et al.* Perinatal exposure of mice to the pesticide DDT impairs energy expenditure and metabolism in adult female offspring. *PLoS One* 9, e103337 (2014).
48. Kim, J. *et al.* 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture. *Pestic Biochem Physiol* 131, 40-45 (2016).
49. Pestana, D. *et al.* Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Sci Rep* 7, 2738 (2017).

PŘÍLOHA VII

DVOŘÁKOVÁ, J., ČEDÍKOVÁ, M., MALEČKOVÁ, A., KULDA, V., TONAR, Z. a D. MÜLLEROVÁ. Vznik a vývoj tukové kapénky a její role ve zdraví a nemoci. *Časopis lékařů českých* [online]. 2018; 157(5):254-262. PMID: 30441938.

Vznik a vývoj tukové kapénky a její role ve zdraví a nemoci

¹Jana Dvořáková, ²Miroslava Čedíková, ^{3,4}Anna Malečková, ¹Vlastimil Kulda, ³Zbyněk Tonar, ⁵Dana Müllerová

¹Ústav lékařské chemie a biochemie LF UK Pizeň

²Ústav fyziologie LF UK Pizeň

³Ústav histologie a embryologie LF UK Pizeň

⁴Biomedicínské centrum LF UK Pizeň

⁵Ústav hygieny a preventivní medicíny LF UK

Čas. Lék. čes. 2018; 157: 254–262

SOUHRN

Tukové kapénky nacházíme ve většině buněk, kde jsou potřebné pro metabolismus lipidů a energetickou homeostázu. Jejich biogeneze je zatím málo prozkoumaný proces, při kterém z dvouvrstvé membrány hladkého endoplazmatického retikula vzniká organela s monomolekulární vrstvou na povrchu. Velké tukové kapénky se mohou tvořit buď růstem, nebo spojováním menších tukových kapének. Jejich základními funkcemi jsou kontrolované ukládání a řízený metabolismus lipidů a ochrana intracelulárního prostředí před lipotoxicitou. V současné době je dysfunkce tukové kapénky spojována s řadou onemocnění, jako jsou obezita, kardiometabolický syndrom, nádorová a neurodegenerativní onemocnění, lipodystrofie a kachexie.

KLÍČOVÁ SLOVA

tuková kapénka, adipocyt, endoplazmatické retikulum, perilipin, obezita, diabetes mellitus 2. typu, lipodystrofie

SUMMARY

Lipid droplets are found in most cells, where they are needed for lipid metabolism and energy homeostasis. Their biogenesis is still not entirely described process, in which an organelle with monomolecular layer on the surface originates from two-layer membrane of the smooth endoplasmic reticulum. Large lipid droplets can be formed either by growth or by fusion of smaller lipid droplets. Their basic functions are controlled lipid deposition and lipid metabolism and the protection of the intracellular environment from lipotoxicity. Currently, dysfunction of lipid droplet is associated with a number of diseases such as obesity, cardiometabolic syndrome, tumor and neurodegenerative diseases, lipodystrophy and cachexia.

KEYWORDS

lipid droplet, adipocyte, endoplasmic reticulum, perilipin, obesity, type 2 diabetes mellitus, lipodystrophy

ÚVOD

Tukové kapénky byly po mnohá desetiletí považovány jen za pouhý inertní rezervoár zásobní energie ve formě lipidů. Stále více se však potvrzuje jejich nenahraditelná role v mnohých fyziologických i patofyziologických pochodech. Do popředí zájmu se tukové kapénky dostávají zejména z důvodu zvyšující se prevalence obezity, diabetu mellitu 2. typu a dalších složek metabolického syndromu (1).

Jedná se o dynamické organely heterogenní ve struktuře, chemickém složení a tkáňovém rozložení, jež se vyskytují především v adipocytech. V proměnlivém počtu a velikosti jsou nacházeny i v mnoha dalších typech eukaryotických buněk (tab. 1, obr. 1).

Hlavní funkcí tukové kapénky je skladování tuků ve formě hydrofobních triacylglycerolů (triglyceridů). Tato funkce je nejvíce zřetelná u adipocytů bílé tukové tkáně s jednou velkou uniloculární tukovou kapénkou, která vyplňuje většinu cytoplazmy buňky a jádro a další organely utlačuje do periferie. Bílá tuková tkáň je u savců rozptýlená po celém těle. Nejvíce tuku se nachází v podkoží a v intraabdominální oblasti.

Rozeznáváme ještě další dva typy tukové tkáně, hnědou a běžovou. Větší zásoby hnědé tukové tkáně mají kojenci, časem tato tkáň podléhá involuci, ale celý život přetrvává v interskapulárním prostoru, paravertebrálně, axilárně a perirenálně. Hnědá tuková tkáň je termogenním orgánem. Její buňky jsou menší než buňky bílé tkáně, obsahují větší

množství malých tukových kapének a hodně mitochondrií. Běžovou tukovou tkání jsou nazývány hnědé adipocyty vyskytující se po termogenní stimulaci v anatomických místech odpovídajících bílé tukové tkáni. Tento proces se nazývá hnědnutí tukové tkáně. Běžovou tukovou tkání můžeme charakterizovat kombinací obou předešlých typů. Její buňky jsou prostřední velikosti, mají více větších tukových kapének a o něco méně mitochondrií než buňky hnědé tukové tkáně (16).

Pro všechny organismy představuje schopnost skladovat energii evoluční výhodu. Mezi další buněčné funkce, na kterých se tukové kapénky podílejí a jež se nevztahují přímo k metabolismu lipidů, se řadí například ukládání a degradace proteinů a imunitní odpověď (17). Všechny funkce tukových kapének jsou dány jejich unikátní strukturou (18–20).

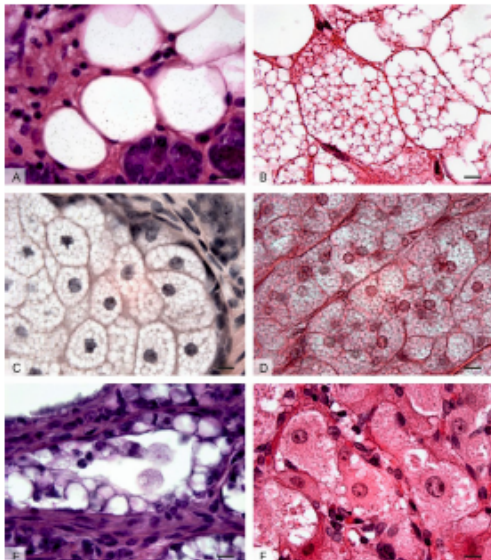
STRUKTURA TUKOVÉ KAPÉNKY

Tukové kapénky (obr. 2) jsou útvary kulovitěho tvaru, které mohou být seskupeny do hroznovitých struktur (21). Jejich průměr se pohybuje v rozmezí 0,1–5 μm u netukových buněk, u bílých adipocytů pak mohou dosahovat velikosti > 100 μm (22).

Povrch kapének není ohraničen konvenční biologickou membránou, jako je tomu u jiných organel, které mají vodný obsah uvnitř membrány tvořené fosfolipidovou dvouvrstvou. Tukové kapénky jsou tvořeny hydrofobním jádrem

Tab. 1 Příklady výskytu tukových kapének a jejich funkce v různých buněčných typech

Buněčný typ	Funkce tukové kapénky
Adipocyt (1) Hepatocyt (2) Kardiomyocyt (3) Myocyt kosterní svaloviny (4)	Energetická zásoba, udržování homeostázy, ukládání nadbytečných tuků jako ochrana proti lipotoxicitě
Itova buňka v játrech (5) Buňky <i>zona fasciculata</i> v kůře nadledvin (6)	Skladování vitamínů rozpustných v tucích (vitamin A) Skladování esterů cholesterolu a dalších prekurzorů pro syntézu glukokortikoidů
Leydigovy buňky varlat (7) Buňky <i>theca interna</i> vaječnicků (7) Buňky žlutého tělíska (8)	Skladování esterů cholesterolu pro syntézu steroidních hormonů
Chondrocyt (9)	Ukládání nenasycených mastných kyselin – energetická zásoba
Sebocyt (10)	Sekreční, udržování permeability kožní bariéry
Epitelové buňky alveol mléčné žlázy (11)	Sekreční, tvorba mléka
Vaječná buňka živočichů (12)	Energetický zdroj pro embryogenezi
Makrofág (13)	Řízení lipidové signalizace, cíl útoku patogenů
Pneumocyt II. typu (14)	Sekreční, tvorba surfaktantu
Enterocyt (15)	Přechodné uložení lipidů při absorpci z potravy, cíl útoku patogenů, např. rotavírů a enterovírů



Obr. 1 Tukové kapénky v různých buněčných typech:

A: Adipocyty bílého tukového vaziva *glandula parotis*. Velká tuková vakuola vyplňuje téměř celou buňku („prázdné“ prostory uvnitř buňky). Jádro a ostatní orgány jsou v adipocytech bílého tukového vaziva umístěny excentricky na okraji buňky a společně s úzkým lemem cytoplazmy vytvářejí na běžných histologických preparátech tvar pečutního prstenu.

B: Multilokulární adipocyty hnědé tukové tkáně obsahující velké množství tukových kapének menších rozměrů.

C: Mazové žlázy kůže s holokrinním způsobem sekrece. Světlé sebocyty obsahující velké množství menších tukových kapének, jejichž nahromadění postupně vede k porušení cytoplazmatické membrány a tím pádem k jejich uvolnění společně s buněčným obsahem – kožním mazem (sebem).

D: Epitelové buňky kůry nadledvin *zona fasciculata* uspořádané do podlouhlých provazců. V buňkách se nachází velké množství tukových kapének s obsahem neutrálních lipidů, fosfolipidů a cholesterolu, který slouží jako prekurzor syntézy steroidních hormonů – glukokortikoidů.

E: Mléčná žláza v laktacním období s apokrinním způsobem sekrece. Světlé galaktocyty vyskytující se v sekrečních alveolech mléčné žlázy hromadí v apikální části cytoplazmy tukové kapénky, které se společně s tenkou vrstvou apikální cytoplazmy uvolňují do mléka.

F: Granulóza-luteinní buňky vaječnicku *corpus luteum* s pěnítou (vakuolizovanou) cytoplazmou, jejíž vzhled je podmíněn množstvím tukových kapének. Podobně jako buňky kůry nadledvin, granulóza-luteinní buňky jsou producenty steroidních hormonů – progesteronu.

Foceno imerzním objektivem se 100násobným zvětšením (měřítko = 10 μ m). Preparáty barveny hematoxylinem a eozinem.

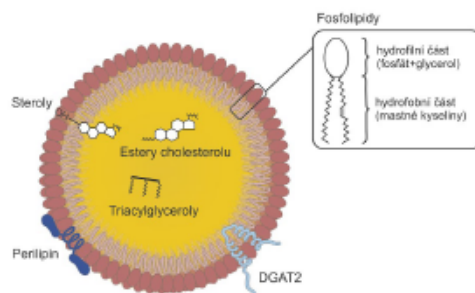
z neutrálních lipidů pokrytých monomolekulární fosfolipidovou vrstvou. Ta je tvořena více druhy fosfolipidových molekul (21). Nejhojněji je zastoupen fosfatidylcholin (PC), v menším množství je nalézán fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), lysofosfatidylcholin (lysoPC) a lysofosfatidyletanolamin (lysoPE). Dále mohou být ve fosfolipidové membráně identifikovány amfifilní proteiny (mj. perlipiny v tukových buňkách a buňkách produkujících steroidní hormony). Rovněž se zde může nacházet volný cholesterol, který se pravděpodobně vyskytuje i uvnitř tukové kapénky (1).

K povrchu tukové kapénky jsou přichyceny specifické proteiny, z nichž se mnohé účastní metabolismu lipidů. Většina tukových kapének má na povrchu 50–200 různých

proteinů. Spektrum proteinů se může lišit mezi tukovými kapénkami různých velikostí nebo různé lipidové kompozice. Složení monomolekulární vrstvy je velmi důležité pro regulaci velikosti tukové kapénky a pro její schopnost komunikovat a interagovat s ostatními tukovými kapénkami nebo organelami, např. s endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi (23).

Další skupinu představují proteiny, které se nacházejí uvnitř kapénky. Hydrofilní proteiny pravděpodobně samy v kapénce neexistují, ale amfifilní proteiny se mohou skládat s fosfolipidy a vytvářet struktury kompatibilní s hydrofobním prostředím (1). Jedná se například o proteiny ze skupiny perilipinů, tj. *tail-interacting protein* (TIP47) a adipofilin (ADRP),

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK



Obr. 2 Struktura tukové kapénky.

V monovrstvě na povrchu jsou částečně polární (amfipatické) fosfolipidy a steroidy. V hydrofobním jádře jsou uskládnány triacylglyceroly a estery cholesterolu. Na povrchu tukové kapénky jsou různé proteiny syntetizující neutrální lipidy (např. DGAT2) a proteiny skupiny PAT řídící ukládání a využití tuků (např. perlipin).

u nichž se předpokládá zapojení i do nitrobuňčného metabolismu lipidů (24).

V tukové kapénce se stádají neutrální tuky – triglyceridy a estery cholesterolu. V bílých adipocytech jsou uloženy převážně triglyceridy, ale ve většině ostatních buňčných typů koexistují triglyceridy a estery cholesterolu v různých poměrech. Předpokládá se, že triglyceridy a estery cholesterolu jsou od sebe odděleny. Estery cholesterolu tvoří pod povrchem monofosfolipidové membrány koncentrické vrstvy, zatímco triglyceridy jsou víceméně náhodně uspořádány v centru tukové kapénky (25). K podobnému oddělení může docházet také mezi triglyceridy, z důvodu velké rozdílnosti teploty tání závislé na složení mastných kyselin. Pod kryoelektronovým mikroskopem jsou pozorovány soustředěné linky vzhledu slupky cibule, což zřejmě odráží toto dělení mezi lipidy (19).

BIOGENEZE TUKOVÉ KAPÉNKY

V současnosti existují dvě hlavní hypotézy procesu tvorby tukových kapének (lipogeneze) (1). Podle jedné z nich vznikají tukové kapénky *de novo*, podle druhé mohou být odvozeny od již existujících tukových kapének dělením. Upřednostňován je proces vzniku *de novo*. Tento proces probíhá ve třech fázích. Nejprve dochází k syntéze neutrálních lipidů, pak k jejich akumulaci a vzniku číčkované formace a nakonec k samotnému vzniku tukové kapénky odškrcením z endoplazmatického retikula směrem do cytosolu (23).

SYNTEZA NEUTRÁLNÍCH LIPIDŮ

Neutrální lipidy jsou syntetizovány izoformami enzymů vázaných v membráně endoplazmatického retikula, a to acyl-CoA:diacylglycerol-acyltransferázami (DGAT1, DGAT2) a acyl-CoA:cholesterol-acyltransferázami (ACAT1, ACAT2). Experimentálně bylo zjištěno, že zatímco DGAT2 je pro život nezbytná, DGAT1, ACAT1 a ACAT2 nikoliv (26). Svě substráty potkávají tyto enzymy přímo v endoplazmatickém retikulu. Jeden z běžných substrátů odvozený od mastných kyselin je acyl-CoA produkovaný acyl-CoA-syntetázou (ACSL); navázání mastné kyseliny na acyl-CoA ji aktivuje pro použití v metabolických drahách. Enzymy DGAT využívají acyl-CoA

a diacylglycerol k vytvoření triacylglycerolů. Podobně jsou estery cholesterolu produkovány kondenzací acyl-CoA s cholesterolem za katalýzy ACAT (23).

AKUMULACE LIPIDŮ A VZNIK ČOČKOVITÉ FORMACE

Vzniklé lipidy se akumulují v hladkém endoplazmatickém retikulu na místech, která jsou od syntetizačních enzymů oddělená. Po nahlomádění určitého množství a překročení konkrétního práhu se v endoplazmatickém retikulu vytvoří tukové čočky, které se vyklenují směrem do cytoplazmy. Tomu, aby se tuková kapénka vytvořila směrem do lumen endoplazmatického retikula, brání protein FIT2 (27).

UVOLNĚNÍ TUKOVÉ KAPÉNKY

ODŠKRCENÍM Z ENDOPLAZMATICKÉHO RETIKULA

Nad určitou velikost, v závislosti na fosfolipidovém složení, jsou číčkované formace tuků v endoplazmatickém retikulu nestabilní a mechanismem podobným odškrcení dochází k jejich uvolnění. Nejmenší zralé cytosolové tukové kapénky mají průměr v rozsahu 250–500 nm, ale není vyloučeno, že rodící se kapénky mohou být i menší než 100 nm.

Do vývoje vznikajících tukových kapének jsou zapojeny i některé proteiny, které mohou stabilizovat nebo zlepšovat počáteční konvexní zakřivení kapének. Tuto funkci zřejmě zastává TIP47 ze skupiny perlipinů, který je považován za hlavní regulační protein (28). Nicméně tukové kapénky se tvoří rovněž v organismech, které perlipiny neexprimují. Proto se předpokládá, že tvorba kapének může probíhat spontánně, přičemž proteiny ji mohou pouze usnadňovat nebo regulovat (23).

Dalšími proteiny účastnicími se vzniku tukových kapének jsou například seipin (BCL2L2), lipiny a transmembránové proteiny vyvolávající ukládání tuku (*fat storage-inducing transmembrane proteins 1 a 2*; FIT1/FITM1 a FIT2/FITM2). Seipin je regulátorem katabolismu lipidů, je nezbytný pro diferenciaci adipocytů a pro správné ukládání lipidů. Jedná se o protein endoplazmatického retikula, jehož nedostatek dramaticky snižuje počet a velikost tukových kapének (23). Při absenci seipinu je formování tukových kapének zpožděné. Dochází k akumulaci neutrálních lipidů v endoplazmatickém retikulu, čímž se mohou dostat na nevhodná místa, např. do jádra. Mutace seipinu vedou k některým lipodystrofiám.

Lipidy jsou v savčích buňkách exprimovány v pěti izoformách. Jsou nutné k zabránění velké akumulace neutrálních lipidů v endoplazmatickém retikulu (28). FIT1 je primárně exprimován v kosterním svalstvu a FIT2 v tukové tkáni. Tyto proteiny nesyntetizují triglyceridy, ale nejspíš je rozdělují do vznikajících tukových kapének (29).

RŮST TUKOVÉ KAPÉNKY

Tukové kapénky jsou heterogenní a dynamické struktury, které jsou schopné měnit svůj počet a velikost v závislosti na potřebách buňky. Proto je jejich velikost v maturovaných buňkách různá a závisí na konkrétním buňčném typu a na metabolických podmínkách uvnitř buňky. Největší tukové kapénky nacházíme v adipocytech bílé tukové tkáně, jejichž velké uniloculární tukové kapénky představují efektivní uložení energie. Tvorbu uniloculárních kapének podporují proteiny skupiny CIDE (*cell death-inducing DFF45-like effector*). Členy této skupiny proteinů jsou u savců CIDEA, CIDEB a CIDEF (FspZ). Jsou lokalizované především na kontaktních místech mezi kapénkami, kde usnadňují přenos lipidů z menších

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

reguluje obousměrné pohyby tukových kapének koordinací opačně polárních motorických proteinů (dyneinu a kinesinu). Dynein obstarává pohyb podél vláken mikrotubulů ke konci minus a kinesin ke konci plus mikrotubulů (1). Experimentálně navozená nadměrná exprese nebo naopak nedostatek LSD2 vedla ke vzniku buď obézní, nebo podvyživené mouchy octomilky, což ukazuje, že LSD2 je důležitý pro normální skladování lipidů. Je možné, že aktivní pohyb podél mikrotubulů zvyšuje pravděpodobnost vzájemné fúze a tím podporuje tvorbu větších tukových kapének, které jsou mnohem rezistentnější vůči lipolýze než kapénky menší (12).

Tukové kapénky nejsou v buňce na dráhy vezikulárního transportu přímo napojené, avšak pro správné plnění jejich funkce jsou interakce s jinými buněčnými organelami důležité. Interakce můžeme rozdělit na heterotypické, kdy se jedná o interakce tukových kapének s endoplazmatickým retikulem, mitochondriemi, peroxisomy a endosomy, a na homotypické, což jsou interakce pouze mezi tukovými kapénkami.

Při vzájemné interakci tukových kapének byla zjištěna role proteinu *FspZ* (*fat-specific protein Z*; CIDEA) lokalizovaného na membráně v kontaktních místech. *FspZ* interaguje s adipocytární triglyceridovou lipázou (ATGL) a reguluje tak bazální a stimulovanou lipolýzu. Zprostředkovává tvorbu velkých unilokulárních tukových kapének přítomných v adipocytech obratlovců. Jestliže chybí, adipocyty akumulují menší multilokulární tukové kapénky, které mají relativně zvětšený povrch, a tím k němu mají lipázy snadnější přístup. To však může omezovat skladování lipidů v tukové tkáni a místo toho se mohou lipidy akumulovat v jiných orgánech (např. v játrech) a vyvolávat inzulinovou rezistenci (36).

Endoplazmatickým retikulem souvisejí tukové kapénky už z toho důvodu, že je místem jejich vzniku a slouží také jako prostředník pro dopravu intracelulárních lipidů. Na kontaktním místě tukové kapénky a endoplazmatického retikula je lokalizován integrální membránový protein *seipin*, řídící třídění neutrálních lipidů, fosfolipidů a některých proteinů na tukové kapénce, aby se tím zajistila její identita a zránění (37).

Tukové kapénky se také nacházejí v těsné blízkosti mitochondrií a peroxisomů. V těchto organelách dochází k beta-oxidaci (v mitochondriích u živočichů, v peroxisomech u kvasinek a rostlin), tj. konverzi mastných kyselin na acetyl-CoA. Mezi tukovými kapénkami a mitochondriemi nebo peroxisomy proto musí být zajištěna koordinace mezi dodáváním mastných kyselin a lipolýzou. Fyzický kontakt mezi mitochondrií a tukovou kapénkou zprostředkovává OXPAT (PLIN5) pomocí C-terminální oblasti.

Degradace tukových kapének probíhá lipofágii - vzájemnou interakcí kapének s lyzosomy. Zvýšená lipofágie vede k vyhubování tukových kapének, což může zabránit patologickým stavům, jako je např. steatóza jater (37).

Kromě výše uvedených informací mají tukové kapénky přechodný kontakt s fagosomy. Toto setkání slouží v neutrofylech k dodání kyseliny arachidonové, která je prekurzorem eikosanoidů sloužících pro aktivaci NADPH oxidázy fagosomů (1).

FUNKCE TUKOVÝCH KAPÉNEK

Hlavní funkcí tukových kapének je skladování lipidů, a to v adipocytech i v neadipocytových buňkách. Skladované lipidy slouží hlavně jako energetická zásoba a jsou mobili-

zovány pro beta-oxidaci, biogenezi membrán, posttranslační modifikaci proteinů, syntézu lipoproteinů, steroidů, signálních lipidů, jiných lipidových mediátorů. Slouží jako rezervoár různých proteinů, včetně transkripčních faktorů a komponent chromatinu a také se v nich ukládají vitaminy rozpustné v tucích (5).

Klíčovými enzymy zapojenými v intracelulární degradaci triacylglycerolů v adipocytech i v neadipocytárních buňkách jsou adipocytární triglyceridová lipáza (ATGL) a hormon-senzitivní lipáza (HSL) (38).

Lipidové kapénky rovněž chrání buňku před toxickým účinkem volných mastných kyselin. Ty mohou ohrozit integritu membrány, ale esterifikací do neutrálních triglyceridů se stávají stabilními a neškodnými. (13).

Kromě běžných funkcí souvisejících se skladováním lipidů nebo jejich metabolismem jsou tukové kapénky zapojeny rovněž do dalších důležitých procesů v buňce, i tukových, které se přímo k lipidovému metabolismu nevztahují a jsou často spojené s patologickými stavy (39). Tukové kapénky jsou důležité pro replikaci a životní cyklus virů a jiných intracelulárních patogenů (40). Mezi patogeny využívající tukové kapénky pro svoji proliferaci a přežití patří například *Chlamydia trachomatis* a virus hepatitidy C (HCV) (1).

Významné pro vznik metabolických onemocnění je rovněž uskladnění perzistentních organických polutantů v tukových kapénkách adipocytů. Jedná se o látky jako polychlorované pesticidy, bifenylly, dioxiny a dibenzofurany, bromované zpomalovače hoření a další. Jsou to látky lipofilní, bioakumulativní, do lidského těla se dostávají hlavně živočišnou tučnou potravou. Radíme je mezi tzv. endokrinní disruptory, protože poškozují embryonální vývoj a reprodukční schopnosti a podílejí se na vzniku obezity a jejich komorbidit, zejména rozvoji diabetu mellitu 2. typu (41).

Je známo, že tukové kapénky hrají důležitou roli i v imunitním systému. Jsou místem syntézy eikosanoidů, signálních lipidů ovlivňujících například zánět, bolest a kontrakce hladké svaloviny. Pro jejich syntézu je prekurzorem kyselina arachidonová (42).

PATOLOGICKÉ STAVY SPOJENÉ S TUKOVÝMI KAPÉNKAMI

S nedostatkem nebo naopak nadbytkem tukových kapének v buňce je spojeno široké spektrum onemocnění (tab. 2). Pochopení mechanismů, jež se v kapénkách odehrávají, může osvětlit řadu patologických stavů a poskytnout přehled k jejich léčbě (43).

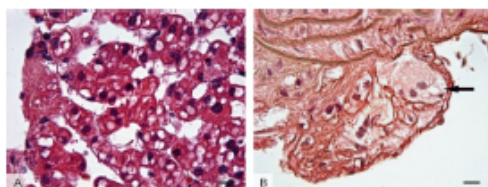
LIPODYSTROFIE

Lipodystrofie jsou poruchy charakterizované ztrátou tukové tkáně. Buď může jít o klinické projevy celkové, vrozené generalizované lipodystrofie, nebo částečné, familiární parciální lipodystrofie. Protože je porušena schopnost uchovávat triglyceridy v tukové tkáni, jsou lipidy skladovány v jiných tkáních, což vede k lipotoxicitě a z závažným změnám metabolismu. S nimi jsou běžně spojovány poruchy jako inzulinová rezistence, jaterní steatóza, hypertenze a další metabolické dysfunkce. Nedostatek bílé tukové tkáně vede k deficitu leptinu (adipokinu zajišťujícího energetickou homeostázu) a k inzulinové rezistenci. Mnoho závažných lipodystrofií lze korigovat podáváním leptinu.

Lipodystrofie jsou způsobené defekty řady genů, z nichž mnohé řídí syntézu triglyceridů nebo ukládání proteinů

Tab. 2 Patologické stavy asociované s dysfunkcí tukových kapének

Onemocnění	Přítomnost a role tukové kapénky
Lipodystrofie (43)	Nedostatek bílé tukové tkáně způsobený genetickým defektem, akumulace lipidů v jiných tkáních
Kachexie (43)	Ztráta tukové tkáně při nádorovém onemocnění zvýšenou lipolýzou
Chanarinův-Dorfmanův syndrom (ichtyóza) a myopatie (43)	Genetická porucha, deficit degradace triacylglycerolů, akumulace tuků v jiných tkáních
Obezita, metabolický syndrom a diabetes (43)	Překročení kapacity tukové tkáně, nadměrné zmnožení tukových kapének, hypertrofie adipocytů, porucha hormonální funkce tukové tkáně, akumulace tuku i v jiných tkáních
Steatóza jater (43)	Akumulace tukových kapének v hepatocytech (obr. 4A)
Kardiovaskulární onemocnění (43)	Překročení kapacity tukových kapének pěnových buněk (makrofágů) strádajících estery cholesterolu (obr. 4B)
Onemocnění nervového systému (13, 44, 45)	Hromadění tukových kapének v gliích při neurodegeneraci, mutace genů účastnících se biologických procesů v tukových kapěnkách
Nádorová onemocnění (45, 46)	Zvýšené množství tukových kapének u buněk agresivnějších nádorů
Enterocyty (15)	Přechodné uložení lipidů při absorpci z potravy, cíl útoku patogenů, např. rotavirů a enterovirů


Obr. 4 Histologický obraz tkání u patologických stavů spojených s tukovými kapěnkami:

A: Játra prasete domácího s obrazem jaterní steatózy s nahromaděním tukových kapének v cytoplasmě hepatocytů. B: Preparát karotidy myši s aterosklerotickým plátem stadia II histologické klasifikace. V subendotelové vrstvě vaziva se nacházejí velké pěnové buňky – mnohojaderné makrofágy s nahromaděním tukových kapének (šipka).

a jsou zapojeny v tvorbě a regulaci tukových kapének. Především se jedná o 1-acylglycerol-3-fosfát-O-acyltransferázu 2 (AGPAT2), lipin 1 (LPIN1; způsobuje lipodystrofii pouze v myších modelech), dále seipin (BSCL2). Seipin je vestavěný do membrány endoplazmatického retikula a inhibuje diferenciaci adipocytů a potlačuje expresi PPAR-γ. K lipodystrofiím vede také nedostatek membránového proteinu kaveolinu 1 (CAV1). Bylo pozorováno, že částečné lipodystrofie jsou rovněž způsobeny mutacemi dvou proteinů v tukové kapénce – perilipinu 1 (PLIN1) a CIDEC, který hraje významnou roli v apoptóze. Mutace CIDEC brání tvorbě unilokulárních tukových kapének v adipocytech (43).

KACHEXIE

Kachexie je komplexní metabolický syndrom častý zejména u pacientů s gastrointestinálními, prostatickými a plicními karcinomy. Metabolismus lipidů se u nich zásadně mění, což vede k dramatickému snížení jejich tělesné hmotnosti způsobenému ztrátou tukové tkáně a poté i k atrofií kosterního svalstva.

Klíčovým faktorem při kachexii je zvýšená lipolýza, která je zprostředkována ATGL (adipocytární triglyceridovou lipázou), nikoliv HSL (hormon-senzitivní lipázou), jak se dříve předpokládalo. Myši s nefungující ATGL jsou chráněny před ztrátou tukové tkáně (ne však před ztrátou kosterního svalstva) a po indukci kachexie nemají zvýšenou lipolýzu na-

vzdory vysokým hladinám faktorů mobilizujících lipidy, jako jsou zink-alfa-2-glykoprotein 1 (AZGP1), tumor nekrotizující faktor α (TNF-α) nebo interleukin 1 (IL-1). Zánětlivé a lipolytické mediátory, jež aktivují ATGL potenciálně vylučované nádorem, tedy mohou v kachexii způsobit nekontrolovanou ztrátu tukové tkáně (43).

CHANARINŮV-DORFMANŮV SYNDROM (ICHTYÓZA) A MYOPATIE

Tato onemocnění tvoří heterogenní skupinu autosomálně recesivně dědičných poruch charakterizovaných deficitem degradace triglyceridů a jejich následnou akumulací v mnoha tkáních a orgánech, jako jsou kůže, játra, svaly, střeva, oči a uši.

Chanarinův-Dorfmanův syndrom (ichtyóza) je způsoben mutacemi genu CGL-58. Při tomto postižení je narušena oxidace mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Výsledkem je poškození propustnosti kůže.

Mutace ATGL způsobují abnormální skladování neutrálních lipidů, provázené některými závažnými typy kardiomyopatií. Výzkumy naznačují, že při léčbě by mohlo být užitečné použití agonistů PPAR-α, kteří dokážou zvrátit mitochondriální dysfunkci a akumulaci lipidů v srdci a obnovit tak jeho funkci (43).

OBEZITA, METABOLICKÝ SYNDROM A DIABETES

Obezita se stala vzhledem k sedavému životnímu stylu a nezdravým stravovacím návykům celosvětovým zdravotním problémem. Jedná se o obtížně léčitelné onemocnění, proto se intenzivně zkoumají možnosti medikamentózní léčby, při níž se využívá hlavně tlumení chuti k jídlu, blokáda vstřebávání tuku v trávicím traktu, ovlivnění hormonů trávicího traktu (inkretinů) a nově blokáda zpětné absorpce glukózy v ledvinách (47).

Obezita může vést k metabolickému syndromu, což zvyšuje riziko vzniku diabetu 2. typu, steatohepatitidy a kardiovaskulárního onemocnění.

Hypertrofované adipocyty nevyklučují dostatek adipokinů k udržení citlivosti na inzulin. Zvyšuje se množství zánětlivých cytokinů, například MCP-1, TNF-α, IL-6. Tuková tkáň je infiltrována aktivujícími se makrofágy. TNF-α snižuje hladiny buněčného perilipinu, což vede ke zvýšení bazální lipolýzy a hladiny volných mastných kyselin v krvi. Tyto

efekty TNF- α vyvolávající inzulinovou rezistenci mohou být antagonistizovány antidiabetiky typu thiazolidindionů.

Za normálních podmínek skladuje tuková tkáň mastné kyseliny ve formě neutrálních triglyceridů. Při metabolickém syndromu je však rezervoárová funkční kapacita tukové tkáň překročena a volné mastné kyseliny se pak hromadí v kosterním svalstvu, srdci či játrech. Působí zde lipotoxicky a spolupodílí se na rozvoji metabolického syndromu s inzulinovou rezistencí.

Na buněčné úrovni zde dochází při akumulaci triglyceridů k nadměrnému zmožení tukových kapének. V adipocytech pak jde o zvětšení tukové kapénky s následkem celkového zvětšení buňky. Patologii nadměrného ukládání triglyceridů mohou ovlivnit proteiny asociované s tukovými kapénkami. Pro unilokulární tukové kapénky jsou klíčové proteiny FSP27/CIDEA a perilipin 1.

FSP27/CIDEA ovlivňuje vývoj metabolického syndromu regulací ukládání triglyceridů v adipocytech a jeho polymorfismy ovlivňují riziko obezity. Expresí perilipinu 1, lokalizovaného rovněž na povrchu tukových kapének, je důležitým faktorem asociovaným s obezitou. Chrání kapénku před bazální lipolýzou, ale když dojde ke stimulaci lipolýzy, reguluje přístup lipáz ke kapénce. Vysoké hladiny exprese těchto proteinů podporují skladování triglyceridů v tukové tkáni, chrání před lipotoxicitou a inzulinovou rezistencí (43).

STEATÓZA JATER

Metabolický syndrom je často doprovázen jaterní steatózou, tj. akumulací tukových kapének s triglyceridy v hepatocytech. V játrech postižených steatózou hepatocyty exprimují perilipin 1, který se normálně vyskytuje pouze v tukové tkáni. Se zvýšeným rizikem vývoje jaterní steatózy jsou spojeny i polymorfismy a genetické variace dalších genů, např. PNPLA (adiponutrinu), jaterní lipáza (LIPC/HTGL) a lysofosfolipáza 1 (LYPLAL1) a enzymy DGAT2 zapojené v syntéze triglyceridů.

Riziko steatózy jater se také silně zvyšuje po infekci virem hepatitidy C, která vyvolává metabolické změny v infikovaných hepatocytech. Mechanismus šíření virových částic je závislý na DGAT1 a tukových kapénkách. Vir HCV inhibuje lipolýzu, tím tukové kapénky stabilizuje, a tak může indukovat vznik steatózy (43).

KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

Castou příčinou úmrtí v průmyslových zemích je ateroskleróza. Při ní se v cévách ukládají estery cholesterolu, což může vést k infarktu myokardu, cévní mozkové příhodě nebo náhlé srdeční smrti. Estery cholesterolu jsou v cévách uloženy hlavně v tukových kapénkách pěnových buněk (makrofágy střídající lipidy). Hromadění esterů cholesterolu makrofágy má funkci ochrannou, protože volný cholesterol je pro buňky toxický a prozánětlivý. Toto skladování esterů cholesterolu v tukových kapénkách podporují některé jejich proteiny, např. ADRP, CIDEA a CIDEA. Překročení kapacity akumulace cholesterolu nad odstraňujícími mechanismy vede k tvorbě plátu, erozi, prasknutí plátu a následně trombóze (43).

ONEMOCNĚNÍ NERVOVÉHO SYSTÉMU

Ve zdravých neuronech a gliích se vyskytují tukové kapénky velmi málo nebo vůbec. K hromadění tukových kapének v gliích však dochází při zvýšení hladiny reaktivních kyslíkových radikálů, které je způsobeno mitochondriální dysfunkcí v neuronech. Protože metabolismus lipidů vzhle-

dem ke svým membránovým a signálním funkcím hraje v nervovém systému klíčovou roli, byla již nalezena řada důkazů o spojitosti tukových kapének s neurodegenerací.

Tukové kapénky byly detekovány v axonech neuronů, v kultivovaných neuronech a v částech mozku při Huntingtonově chorobě. Její příčinou je mutace v genu HTT pro protein huntingtin. Tato choroba se projevuje mimovolními pohyby, depresemi, psychózou, paranoiou a demencí.

Byla objevena také souvislost mezi α -synukleinem a tukovými kapénkami. Synuklein je protein, jehož dysfunkce nebo naopak nadměrná exprese může způsobit Parkinsonovu chorobu. Laboratorně bylo prokázáno, že se váže na lipidové kapičky.

Dědičné spastické paraplegie jsou poruchy charakterizované degenerací axonů motorických nervů, slabostí dolních končetin a spasticitou. Mnoho genů, které se tohoto onemocnění účastní, má ústřední roli v biologii tukových kapének, např. atlastin, REEP1, seipin, spartin, spastin a kinesin1 (13).

Součástí této skupiny genetických poruch je i Troyerův syndrom, který způsobuje degeneraci a odumírání svalových buněk a motorických neuronů. Je způsoben mutací genu SPC20, který kóduje spartin, multifunkční protein tukové kapénky, který je esenciální pro životaschopnost neuronů (44). Spartin se váže na TIP47 a spolu konkurují ADRP ve spojení s tukovou kapénkou. Pokles nebo nadměrná exprese spartinu vede ke zvýšení počtu a velikosti tukových kapének. Mutovaný spartin nemůže ADRP konkurovat a způsobuje onemocnění Troyerovým syndromem (1).

NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Bylo zjištěno, že počet lipidových kapének ve zdravých buňkách prsu je asi poloviční než u nádorových buněk prsu, a dokonce až 4x nižší než u agresivních maligních buněk prsu. Zvýšené množství lipidových kapének tedy koreluje se zvýšenou agresivitou nádoru a může být spojeno se zvýšenou rychlostí syntézy lipidů v nádorových tkáních. Tento zvýšený metabolismus transformovaných buněk poskytuje většinu lipidů potřebných pro rychlou proliferaci nádorových buněk (46).

Kolorektální karcinom je ve světě třetím nejběžnějším druhem nádoru u mužů a druhým u žen. Předpokládá se, že za recidivu rakoviny po terapii jsou zodpovědné rakovinné kmenové buňky (CSC). Proto je důležitá identifikace jejich specifických markerů. Ramanovou spektroskopií bylo jasně odhaleno, že výraznou známkou buněk CSC při rakovině tlustého střeva je vysoká hladina tukových kapének. Tento poznatek je důležitý pro další terapeutické postupy (45).

ZÁVĚR

Tukové kapénky jsou buněčné orgány, které hrají zásadní roli v uskladňování energie ve formě zásobních lipidů. Chrání přitom intracelulární prostředí buňky před lipotoxickým účinkem volných mastných kyselin. Podílí se na kontrolované lipolýze, ve specifických buňkách i syntéze steroidních hormonů a dalších derivátů lipidů.

V posledních letech bylo popsáno mnoho nových bílkovin, přítomných ať už na povrchu či uvnitř organely, které se podílí např. na její velikosti, aktivním pohybu, modulaci bazální či aktivované lipolýzy, kontaktu s dalšími buněčnými organelami, jako je endoplazmatické retikulum či mitochondrie.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

22. Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J et al. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 263–279.
23. Wilfling F, Haas JT, Walther TC et al. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 29: 39–45.
24. Robenek H, Lorkowski S, Schnoor M, et al. Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies. *J Biol Chem* 2005; 280: 5789–5794.
25. Czabany T, Wagner A, Zweytick D et al. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2008; 283: 17065–17074.
26. Wilfling F, Haas JT, Walther TC et al. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 29: 39–45.
27. Chen X, Goodman JM. The collaborative work of droplet assembly. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1862: 1205–1211.
28. Hashemi HF, Goodman JM. The life cycle of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 33: 119–124.
29. Gross DA, Zhan C, Silver DL. Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 19581–19586.
30. Schuidiner M, Bohnert M. A different kind of love – lipid droplet contact sites. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1862: 1188–1196.
31. Boschi F, Rizzatti V, Zamboni M et al. Models of lipid droplets growth and fission in adipocyte cells. *Exp Cell Res* 2015; 336: 253–262.
32. Boström P, Andersson L, Rutberg M et al. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1286–1293.
33. Farese RV, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009; 139: 855–860.
34. Garcia EJ, Vevea JD, Pon LA. Lipid droplet autophagy during energy mobilization, lipid homeostasis and protein quality control. *Front Biosci Landmark Ed* 2018; 23: 1552–1563.
35. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 419–440.
36. Barbosa AD, Savage DB, Siniossoglou S. Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 91–97.
37. Barbosa AD, Siniossoglou S. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1864: 1459–1468.
38. Morak M, Schmidinger H, Riesenhuber G et al. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. *Mol Cell Proteomics MCP* 2012; 11: 1777–1789.
39. Murphy S, Martin S, Parton RG. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(6): 441–447.
40. Rolingard P, Melo RCN. Lipid droplet hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 2017; 19(1), doi: 10.1111/cmi.12688.
41. Mšilerová D, Pešta M, Dvořáková J et al. Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiol Res* 2017; 66: 653–662.
42. Bozza PT, Viola JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 82: 243–250.
43. Krahmer N, Farese RV, Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 2013; 5(7): 973–983.
44. Bizzari S, Hamzeh AR, Nair P et al. Novel SPG20 mutation in an extended family with Troyer syndrome. *Metab Brain Dis* 2017; 32(6): 2155–2159.
45. Tirinato L, Liberale C, Di Franco S et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells Dayt Ohio* 2015; 33: 35–44.
46. Abramczyk H, Surmacki J, Kopeć M, et al. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst* 2015; 140: 2224–2235.
47. Svačina S, Sucharda P, Stránská Z a kol. Perspektivy farmakoterapie obezity. *Časopis lékařů českých* 2014; 153: 127–130.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.
Ústav fyziologie LF UK
alej Svobody 76, 323 00 Pízeň
Tel.: 377 593 354
e-mail: miroslava.cedikova@lfp.cuni.cz