

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Disertační práce

Plzeň 2023

Iva KLADNICKÁ

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie

**Xenobiotika v potravinách a jejich vliv na lidský
organismus**

**Xenobiotics in food and their effects on the human
organism**

Disertační práce

Školitel:

prof. MUDr. Dana Müllerová, Ph.D.

Plzeň, 2023

Mgr. Iva Kladnická

Abstrakt

Jednou z cest expozice lidského organismu cizorodým látkám, xenobiotiky, je jejich příjem potravinami. Většina xenobiotik jsou lipofilní látky, které se kumulují v organismu a při dlouhodobém a nadlimitním příjmu mají negativní vliv na zdraví člověka. Z hlediska prevence jsou důležité stravovací návyky lidí, identifikace, vyhodnocení a řízení rizik pocházejících z potravin. Distribuci lipofilních cizorodých látek v organismu ovlivňuje velikost tukové tkáně, která je jejich hlavním úložištěm. Dosud nevyřešenou otázkou zůstává, zda tyto látky uložené v tukové tkáni, mají potenciál ovlivňovat zpětně její vlastní tvorbu (adipogenezí) a fyziologické funkce. Tyto poznatky by byly nesmírně cenné, neboť s obezitou spojená dysfunkční, zánětlivě změněná tuková tkáň, je příčinou kardiometabolických komplikací obezity, podmíněných systémovou inflamací, ektopickým ukládáním tuku a multiorgánovým poškozením.

Studie byla zaměřena na základní patofyziologické mechanismy na úrovni adipocytů, a to konkrétně na výzkum rizikových a protektivních faktorů. Z ochranných faktorů byl sledován vliv fytoprotektivních látek s antioxidačním potenciálem. Z rizikových faktorů se jednalo o studium vlivu perzistentních organických polutantů (POP's). Expozice POP's byla sledována jak v průběhu diferenciací mezenchymálních kmenových buněk na adipocyt, tak i jako chronický vliv rizikových faktorů na již zralý adipocyt.

V modelovém experimentu chronické expozice 2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethylenu (p,p' DDE) u diferencujícího se adipocytu z lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC) byly hodnoceny ve dnech 0, 4, 10 a 21 základní parametry, jako je velikost a množství tukových vakuol v adipocytu, transport a skladování látek v tukových vakuolách, metabolismus buňky prostřednictvím mitochondriální respirace, tvorby adenosintrifosfátu (ATP), reaktivních forem kyslíku či aktivity superoxiddismutázy. Při hodnocení byly využity metody barvení fluorescenční sondou, barvení Oil Red O, nepřímá fluorescence, respirometrie s vysokým rozlišením, měření aktivity citrát syntázy a mitochondriálního membránového potenciálu (MMP). Výsledky byly hodnoceny statisticky pomocí softwaru MATLAB statistic Toolbox (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) a OriginPro 2017 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

Prokázali jsme rozdílné ovlivnění adipocytární diferenciací v závislosti na chronické dávce polutantu, kdy při nižších koncentracích (1 μM p, p'-DDE) došlo u maturovaného adipocytu k zvýšení MMP, bazální a s ATP vázané mitochondriální respirace, což ve svém výsledném účinku ukazuje na obezogení potenciál sníženou produkci tepla, zvýšenou schopností proliferace a viability adipocytu. Chronická expozice vyšší koncentraci polutantu (10 μM p, p'-DDE) během diferenciací adipocytu naopak diferenciací proces zpomalovala. Tyto experimenty prokázaly schopnost chronické expozice p, p'-DDE zasahovat v průběhu adipocytární diferenciací jak do fyziologického procesu adipogeneze, tak do metabolického programování zralých adipocytů, a to v závislosti na dávce polutantu.

Klíčová slova: Cizorodé látky, tuková tkáň, perzistentní organické polutanty

Summary

One of the exposure pathways to xenobiotics in humans is the food intake. Most of the xenobiotics are lipophilic substances cumulating in the organism, especially in the adipose tissue. If their intake is long-term and excessive, they have negative impact on human health. Eating habits; identification, analysis, and management of risks stemming from foods are important (from a prevention perspective). The adipose tissue influences distribution and especially accumulation of xenobiotics in the organism. Whether substances stored in the adipose tissue are able to affect adipogenesis and physiological functions, remains unclear. Since from the point of view of prevention obesity is associated with systemic inflammation, ectopic fat deposition, and multiorgan dysfunction, resulting in cardiometabolic complications of obesity, this knowledge would be immensely valuable.

The study focused on the basic pathophysiological mechanisms at the level of adipocytes, specifically, the study of risk and protective factors. From preventive factors, the effect of phytoprotective substances with antioxidant potential was studied. Among the risk factors, we concentrated on the impact of persistent organic pollutants (POP's). We observed exposure to POP's during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes, and the impact of chronic exposure on mature adipocytes.

In the model experiment of chronic exposure of adipocyte differentiating from human mesenchymal stem cell (hMSC) to 2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethylene (p,p'-DDE), the basic parameters, such as the size and amount of lipid vacuoles in the adipocyte, transport and storage of substances in lipid vacuoles, cell metabolism via mitochondrial respiration, adenosine triphosphate or reactive oxygen species synthesis, and superoxide dismutase activity were assessed on days 0, 4, 10, and 21. We employed fluorescent probes, oil red O staining, indirect fluorescence, high resolution respirometry, measurement of citrate synthase activity, and measurement of the mitochondrial membrane potential. The statistical analysis the results was performed using MATLAB statistic Toolbox (MathWorks Inc., Natick, MA, USA), and OriginPro 2017 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

We proved different impacts on adipocyte differentiation dependent on the chronic dose of pollutant: In case of lower concentration (1 μM p, p'-DDE), we observed increase of the MMP, an increase of the basal as well as ATP-linked mitochondrial respiration, indicating obesogenic potential by means of decrease of heat production, higher proliferation, and viability of adipocytes. The higher concentration (10 μM p, p'-DDE) slowed down the differentiation process. These experiments demonstrated potential of p, p'-DDE exposure to interfere with physiological adipogenesis and metabolic programming of mature adipocytes in a dose-dependent manner.

Keywords: xenobiotics, adipose tissue, persistent organic pollutants

Prohlášení o autorství

Dovoluji se předložit k posouzení a obhajobě svoji disertační práci završující mé doktorandské studium na Lékařské Fakultě Univerzity Karlovy v Plzni.

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni dne

Mgr. Iva Kladnická

Poděkování

Velice ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Daně Müllerové, Ph.D. a prof. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za jejich odbornou pomoc a lidský přístup nejen během psaní této disertační práce, ale i během celého mého doktorandského studia.

Obsah

Obsah

1 Úvod	9
1.1 Obezita	11
1.2 Etiologie obezity	12
1.3 Obezogeny.....	13
1.4 Rostlinné polyfenoly.....	17
1.5 Tuková tkáň.....	17
2 Hypotéza studie.....	19
3 Cíle práce.....	20
4 Materiál a metody.....	21
5 Výsledky studie.....	32
6 Diskuze	47
7 Závěr.....	51
8 Přehled publikační činnosti autora.....	53
9 Literatura.....	54
10 Příloha	62

SEZNAM ZKRATEK

3T3-L1 - linie myších buněk

AT v DNA - adenin, thymin v deoxyribonukleové kyselině

ATP - adenosintrifosfát

BAT - brown adipose tissue - hnědá tuková tkáň

BRITE adipose tissue - béžová tuková tkáň

C/EBP α - transkripční faktor CCAAT/enhancer-binding protein α

DAPI - 4,6-diamidin-2-fenyindol fluorescenční barvivo

DDE - dichlordifenyldichlorethan

DDT - dichlordifenyiltrichlorethan

DM - diferenciační médium

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DMSO - dimethylsulfoxid

FABP4 - fatty acid binding protein 4 – protein 4 vázající mastné kyseliny

hADMSC's - human adipose-derived mesenchymal stem cells – lidské mezenchymální kmenové buňky derivované z tukové tkáně

HepaRG – RG linie lidských hepatocytů

LD50 - letální dávka - označení pro dávku látky podávané jedincům, která způsobí úhyn

50% testovaných živočichů do 24 hodin od expozice

MMP - mitochondriální membránový potenciál

MSC - mezenchymální kmenové buňky

NAFLD - non-alcoholic fatty liver disease

p,p'- DDE - 2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethylen

PBS - fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PCB - polychlorované bifenyly

POP's - perzistentní organické polutanty

PPAR - receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem

PPAR γ - transkripční faktor receptor γ aktivovaný peroxisomovým proliferátorem

ROS - reactive oxygen species - reaktivní forma kyslíku

VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě

VMK - volné mastné kyseliny

WAT - white adipose tissue - bílá tuková tkáň

1 Úvod

Xenobiotika jsou jakékoli látky tělu cizí, jinak také nazývané cizorodé látky. Za normálních okolností se v organismu nevyskytují a ani nejsou produktem či meziproduktem fyziologického metabolismu. Cizorodá látka může být původu antropogenního i přírodního. Na organismus či životní prostředí vykazuje nežádoucí vliv a od určité dávky se stává jedem.

Studiem účinku těchto látek v lidském organismu se zabývá xenobiochemie a toxikologie. Z hlediska obecné toxikologie sledujeme vztah mezi látkou a jejím toxickým účinkem na živý organismus. Mechanismus toxického účinku látky je totožný s jejím mechanismem farmakologickým, rozdíl v účinku je v mnoha faktorech jen kvantitativní. Faktorem určujícím toxický účinek je také struktura látky, podle níž lze předpokládat, jaký bude mít látka biologický efekt [Prokeš 2005].

Toxicita látky je ovlivněna mnoha faktory: Kromě jiného místem vstupu do organismu, místem expozice a dobou expozice. Jedním z nejčastějších míst expozice je gastrointestinální trakt, dýchací cesty, sliznice, neporušená kůže a otevřená rána. Toxický účinek může být hodnocen dobou trvání expozice, a to akutní expozicí (jednorázová expozice, inhalace maximálně po dobu 4 hodin, nebo kontakt například přes kůži maximálně 24 hodin), nebo chronickou expozicí. Toxický účinek je ovlivněn místem expozice rychlostí nástupu toxického účinku a velikostí LD50 [Švihovec et al. 2018].

Distribuci látky a jejích metabolitů do jednotlivých buněk, tkání a orgánů a její rychlosti lze sledovat pomocí analytických metod po označení látky markerem, např. fluorescencí pomocí zobrazovacích metod. Distribuce látky a její výsledná koncentrace v jednotlivých orgánech je ovlivněna celou řadou faktorů. Jedná se zejména o fyzikálně chemické vlastnosti látky, akutní či chronickou expozici, schopnost vazby na vysokomolekulární nosič a další. Distribuci lze popsat kinetickými rovnicemi a charakterizovat některými kinetickými konstantami, ale neexistuje univerzální kinetický model distribuce aplikovatelný na všechny látky [Prokeš 2005; Patočka 2003].

Faktor, který nám udává v kterých orgánech či tkáních se látka kumuluje je zejména velikost rozdělovacího koeficientu. Tento faktor udává, v jakém poměru se látka rozděluje mezi vodní a lipofilní fázi [Patočka 2003; Lüllmann et al. 2004].

Místo, ve kterém dochází k ukládání látky, může být místem toxického účinku. Jedním ze specifických míst pro ukládání lipofilních látek (např. DDT, DDE a PCB) je tuková tkáň. Takto uložené látky mohou mít ovlivněnou distribuci, ale také může dojít k poklesu toxicity. Problém nastává při dlouhodobém uvolňování toxické látky z depa v době, kdy již není organismus látky zevně exponován [Patočka 2003].

Dalším významným deponičním místem jsou specifické transportéry (plazmatické a tkáňové bílkoviny), které jsou schopné reverzibilně vázat mnohá xenobiotika. Tyto bílkoviny, např. plazmatické proteiny transferin, albumin a gama-globulin, díky své fyziologické funkci mohou významným způsobem ovlivnit distribuci xenobiotik.

Z hlediska distribuce látek je významná i přítomnost biologických bariér, která je pro některé látky překážkou a pro jiné látky nepředstavuje problém.

Po proniknutí do organismu dochází k biotransformaci, vyjma látek, které biotransformaci nepodléhají a vylučují se ve formě, ve které pronikly do organismu. Většina xenobiotik je metabolizována a vylučována jako metabolity. K biotransformaci xenobiotik dochází v řadě orgánů, mezi nejvýznamnější z nich patří játra. V játrech je proces vázán na hepatocyty, v ostatních orgánech mají tuto schopnost jen některé specializované buňky.

Experimenty testující účinek xenobiotik na lidský organismus jsou prováděny nepřímými metodami buď na laboratorních zvířatech, nebo se jedná o testy in vitro. In vitro modely využívají rostliny, mikroorganismy, tkáňové kultury, buňky apod. Výhodou in vitro testů je možnost využít lidské buňky, nevýhodou je omezený pohled z hlediska toxicity orgánově specifických sloučenin a proto je nezbytné vyhodnotit celou řadu cytologických parametrů a správně vyhodnotit testovací materiál, který má být použit [Knejzlik et al. [b.r.]].

Hlavní cestou expozice pro člověka je požití xenobiotiky kontaminovaných potravin [Swedenborg et al. 2009; Diamanti-Kandarakis et al. 2009]. V posledních 40 letech došlo k dramatickému rozvoji potravinářského průmyslu, který k přípravě vysoce zpracovaných

potravin využívá nové technologie, které přispívají k rozvoji obezity změnou kvality potravin a zvýšeným obsahem některých živin či aditiv [Swedenborg et al. 2009].

Rychlý a významný nárůst prevalence obezity na celém světě za posledních 40 let nelze připisovat pouze hlavním obezogením faktorům, jako jsou genetické rizikové faktory nebo rizikové faktory životního stylu, jako je energeticky bohatá a nutričně chudá strava, sedavý způsob života nebo stárnutí. Přibývá stále více důkazů, že expozice člověka chemizaci prostředí vede k modulaci epigenetických, auto-, para-, endokrinních, imunitních a centrálních nervových regulací, které mohou také přispět k epidemii obezity. Takzvané obezogeny jsou xenobiotika přímo nebo nepřímo podporující adipogenezi a obezitu u zvířat a lidí ovlivňující jedince nebo jejich potomky. Mnoho z těchto látek může také inhibovat nebo modulovat účinek endogenních ligandů jaderných nebo nejaderných transkripčních faktorů, které se účastní diferenciací, metabolismu a sekreční funkce adipocytů [Müllerová a Kopecký 2007].

V medicíně existuje řada příkladů, že synteticky vyrobené látky (i léky) mohou ovlivnit vznik adipozity. Tento obvykle nežádoucí účinek farmak je prokázán u glukokortikoidů, estrogenů, některých antidiabetik (jako je inzulin), thyreostatik, dopaminergních blokátorů, betablokátorů, tricyklických antidepresiv, atypických antipsychotik, antiepileptik, neuropeptidů a euronik gastrointestinálního traktu [D'eon a Mabury 2007; Ellis et al. 2004; Fujii et al. 2013; Kimura et al. 2020; Watkins 1948; Bethea et al. 2017; Grün a Blumberg 2009]. Nejedná se pouze o léky, ale o mnoho jiných sloučenin, které byly v posledních desetiletích antropogenní činností zavedeny do životního prostředí ve velkých dávkách, a byly uznány za schopné působit jako obezogeny.

1.1 Obezita

Pre-obezita (nadváha) a obezita je zdravotní stav vyznačující se abnormálním nebo nadměrným hromaděním tělesného tuku, které představuje riziko pro zdraví (WHO 2019). Podle poslední definice přijaté Evropskou komisí v roce 2021 je obezita chronické, recidivující onemocnění, které je branou k řadě dalších chronických neinfekčních onemocnění, jako jsou diabetes mellitus II. typu, kardiovaskulární a nádorová onemocnění.

Prevalence obezity ve světové populaci v posledních 40 letech exponenciálně vzrostla. V roce 1975 bylo celosvětově z dospělých 6,4 % žen a 3,2 % mužů s obezitou, v roce 2014 se prevalence obezity přibližně ztrojnásobila (14,9 %, resp. 10,8 %). Předpokládá se, že v roce 2025 bude celá pětina dospělé populace trpět obezitou [Lyn et al. 2019]. Pandemie obezity je pravděpodobně způsobena dramaticky změněným životním stylem lidí během relativně krátkého období lidské evoluce. Tato maladaptace je výsledkem komplexních interakcí mezi biologickými, behaviorálními, sociálními a environmentálními faktory, které se podílejí na regulaci energetické bilance a tukových zásob.

Kromě zvýšené mechanické zátěže pohybového aparátu a kardiorespirační výkonnosti je obezita metabolickým onemocněním vznikajícím na podkladě dysfunkční, zánětem změněné bílé tukové tkáně. To vede k chronickému systémovému zánětu, ektopickému hromadění tuku v orgánech a tkáních, prokoagulačnímu stavu, endoteliální dysfunkci, poruchám metabolismu sacharidů, lipidů, proteinů a purinů. Klinicky souvisí s hypertenzí, dyslipidemií, diabetem mellitem II. typu, kardiovaskulárními a nádorovými onemocněními.

Uváděné odhady populačních rizik obezity se prokazatelně pohybují od 5 do 15 % pro úmrtnost ze všech příčin, od – 0,2 do 8 % pro incidenci všech druhů rakoviny, od 7 do 44 % pro incidenci kardiovaskulárních onemocnění a od 3 do 83 % pro výskyt diabetes mellitus II. typu [Flegal et al. 2015].

Histopatologická jednotka dysfunkční tukové tkáně je charakterizována hypertrofií adipocytů s infiltrací makrofágů M1, s narušenou adipogenezí, angiogenezí, lipolýzou a de novo lipogenezí v tukové tkáni.

1.2 Etiologie obezity

Obezita a související poruchy jsou epidemií veřejného zdraví [Janesick et al. 2014]. Na základě nejnovějších odhadů v současnosti postihuje v zemích Evropské unie nadváha 30–70 % a obezita 10–30 % dospělých. Více než 60 % dětí s nadváhou před pubertou bude mít v rané dospělosti nadváhu. Dětská obezita je silně spojena nejen s rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění, diabetes mellitus II. typu, ale také s ortopedickými

problémy, duševními poruchami, nižším školním vzděláním a nižším sebevědomím [Janesick a Blumberg 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE a ProQuest (Firm) 2019].

Obezita je v naprosté většině multifaktoriálním onemocněním. Zatímco psychologická podpora, dietní omezení a zvýšení pohybové aktivity jsou i nadále nejčastěji doporučovanými režimovými opatřeními, stále častěji je obezita léčena jako chronické onemocnění antiobezitiky či bariatricko-metabolickými chirurgickými výkony, pandemie obezity pokračuje v nezměněné míře a celosvětově se zvyšuje zastoupení dospělých i dětí s obezitou a nadváhou [Heindel a Blumberg 2019].

Hlavní příčiny obezity jsou 1) převaha energetického příjmu nad výdejem a konzumace vysoce kalorických potravin, 2) genetický faktor, 3) nedostatek fyzické aktivity a 4) expozice obezogenům (endokrinní distributory nebo diabetogeny) [Grün a Blumberg 2006].

1.3 Obezogeny

Obezogeny jsou xenobiotika přímo nebo nepřímo podporující adipogenezi a obezitu u zvířat a lidí a ovlivňující jedince nebo jejich potomky. Mnoho z těchto chemikálií může inhibovat nebo modulovat účinek endogenních ligandů jaderných nebo nejaderných transkripčních faktorů, které se účastní diferenciace, metabolismu a sekreční funkce adipocytů [Müllerová a Kopecký 2007].

Hlavní cestou expozice člověka je požití kontaminovaných potravin [Swedenborg et al. 2009; Diamanti-Kandarakis et al. 2009; De Coster a van Larebeke 2012]. Lidská činnost znečistila vodu, půdu a potraviny. Obezogeny jsou v současnosti obsaženy v mnoha produktech pro každodenní použití, např. v produktech osobní péče, kosmetice, čisticích prostředcích, hračkách, kuchyňském náčiní, žaluziích, podlahových krytinách, plastových komponentách interiérů aut, závěsech a ubrusech, bytovém textilu, nábytku, matracích a oblečení.

Obezogenní hypotéza předpokládá, že obezogeny mohou působit přímo na buněčné úrovni, kdy dojde ke změně diferenciaci, velikosti adipocytů a počtu adipocytů, zvýšením retence triglyceridů uvnitř adipocytů nebo modifikací rychlosti proliferace adipocytů ve srovnání s buněčnou smrtí. V souhrnu lze říci, že obezogeny podporují adipogenezi a hromadění tuku, narušují řízení příjmu potravy a sytosti, chovají se jako endokrinní disruptory, které potencionálně ovlivňují hormonální regulace [Heindel a Blumberg 2019; Grün a Blumberg 2006].

Ve zkratce lze shrnout, že obezogeny podporují adipogenezi a akumulaci tuků, ovlivňují chuť k jídlu, kontrolu a pocit sytosti a působí jako endokrinní disruptory, které se mohou podílet nejen na změně energetického metabolismu, ale i na změně homeostázy hormonů štítné žlázy, pravděpodobně prostřednictvím aktivace různých transkripčních faktorů, jako jsou receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPAR) [Liu et al. 2018].

V dřívějších studiích byly identifikovány obezogeny, které mají potenciál narušit mnohočetné metabolické signální dráhy ve vyvíjejícím se organismu, což má za následek trvalé změny ve fyziologii u dospělého organismu. Lidé, kteří byli vystaveni obezogenním chemikáliím během prenatálního a perinatálního vývoje, mohou být předem naprogramováni k ukládání zvýšeného množství tuku, což má za následek celoživotní boj o udržení zdravé hmotnosti [Janesick a Blumberg 2016; La Merrill a Birnbaum 2011]. V tomto případě samotné obezogeny nezpůsobují obezitu, ale mohou působit v pozadí scény na podporu přibírání na váze v důsledku vývojového programování tukové tkáně [Eriksson et al. 2018].

Studie polychlorovaného bifenyly 126 (PCB-126) identifikovala transkriptomické a metabolické změny v lidských hepatocytech, HepaRG, které implikují možnou škodlivou roli polutantů v životním prostředí a způsobují nealkoholické ztučnění jater (NAFLD). Tyto dopady také mohou být způsobeny nutričně nevyváženou stravou a/nebo sedavým způsobem života [Angrish et al. 2017].

Biologické mechanismy, které působí na vznik jaterní steatózy, můžeme rozdělit do 4 potencionálních kategorií: zvýšené vychytávání mastných kyselin, snížený výdej lipidů,

zvýšená syntéza mastných kyselin a poškození oxidativního metabolismu těchto látek [Foulds et al. 2017]. Homeostáza jaterních lipidů je totiž udržována vychytáváním hepatocyty a de novo syntézou volných mastných kyselin (VMK), likvidací VMK oxidací nebo syntézou de novo triglyceridů a exportem triglyceridů z hepatocytů jako lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) [Choi a Diehl 2008].

Díky studiím na zvířatech byl objasněn dopad xenobiotik (obezogenů) v etiologii obezity. Na buněčné úrovni probíhají studie převážně na 3T3-L1 buňkách odvozených z myši, ale je tendence postoupit na mezenchymální kmenové buňky odvozené z lidské tukové tkáně. Modely lidských buněk zahrnují různé typy kmenových buněk, které jsou schopny se diferencovat na adipocyty, jmenovitě mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně, které umožňují zkoumání všech fází tvorby adipocytů. Navzdory obavám některých výzkumníků, představují tyto buňky relevantnější model vhodný pro výzkum biologie adipocytů, než většina buněčných linií hlodavců [Sadie-Van Gijsen 2019; Berry et al. 2014].

Studie na buněčné úrovni mohou objasnit obezogení potenciál xenobiotik a jejich metabolitů, včetně posouzení vlivu na tukovou tkáň a diferenciaci. Xenobiotika mohou zvýšit počet diferencujících se preadipocytů a tím zvýšit jejich kapacitu pro ukládání lipidových kapének. Předpokládá se, že zvýšení počtu adipocytů je spuštěno signálními faktory, které indukují nasazení pluripotentních mezenchymálních kmenových buněk sídlících ve vaskulárním stromatu do adipocytární linie. Když se preadipocyty uvolní, jsou vystaveny mitotické klonální expanzi (proliferaci), která prochází dvěma nebo třemi buněčnými děleními, poté postupně získávají typické metabolické a morfologické charakteristiky maturovaného adipocytu v procesu diferenciaci [Tang a Lane 2012]. Všechny tři fáze jsou zásadní pro rozvoj obezity a jsou úzce spojeny se zvýšeným energetickým příjmem po dlouhou dobu [Qiao et al. 2019; Shepherd et al. 1993; Spiegelman a Flier 1996].

Za mechanismem zvýšení počtu diferencujících se preadipocytů a tím zvýšené kapacity pro ukládání lipidových kapének s největší pravděpodobností stojí up-regulace transkripčních faktorů CCAAT/enhancer vázaný protein α (C/EBP α) a receptor γ aktivovaný peroxisomovým proliferátorem (PPAR γ). Jak C/EBP α , tak PPAR γ jsou považovány za

hlavní markery maturovaného adipocytu. C/EBP α je spojován s výrazně vyšší expresí proteinu 4, adipokinu vázajícího mastné kyseliny [Ruiz-Ojeda et al. 2016]. PPAR γ je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který je zodpovědný za růst a vývoj tukové tkáně. Působí jako receptor pro thiasodindiony, jako je např. rosiglitazon, který byl stažen z Evropského trhu [Mohajer et al. 2021; Cipolletta et al. 2012].

Mezi nejčastější obezogeny vyskytující se v potravinách můžeme zařadit přirozeně se vyskytující obezogeny, jako je fruktóza a genistein. Z xenobiotik se jedná o kontaminanty potravin, kterými mohou být jak organické polutanty, tak farmaceutické produkty (viz obrázek 1). Tyto látky přímo ovlivňují funkce endokrinního systému a mohou vést k riziku rozvoje NAFLD [Grün a Blumberg 2006; Newbold et al. 2009; Rubin 2001; Petrakis et al. 2017; Heindel et al. 2015].

V roce 2015 byla rozšířena definice obezogenů o endokrinní disruptory, které ovlivňují další metabolické stavy související s obezitou, které řídí metabolický syndrom, jako je inzulinová rezistence, hypertenze, dyslipidémie a hyperglykémie [Heindel et al. 2015].

1. *Naturally occurring obesogens*
 - Fructose
 - Genistein
2. *Xenobiotics*
 - 2.1 **Contaminants**
 - Pharmaceuticals
 - Diethylstilbesterol
 - Estradiol
 - Rosiglitazone
 - Organic Pollutants (OP's)
 - Industrial Chemicals**
 - Bisphenol A (BPA)
 - Organotins
 - Perfluorooctanoic Acid (PFOA)
 - Phthalates
 - Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)
 - Polychlorinated Biphenyl Ethers (PCBs)
 - Organophosphate Pesticides**
 - Chlorpyrifos
 - Diazinon
 - Organophosphate Pesticides**
 - Dichlordifenyiltrichloretan (DDT),
 - Dichlordifenyiltrichloretan (DDT),
 - Other Environmental Pollutants**
 - Benzo[a]pyrene
 - Fine Particulate Matter (PM_{2.5})
 - Triclosan
 - 2.2. **Additives**

Obrázek 1 - Přehled obezogenů s možným výskytem v potravinách [Kladnicka et al. 2022]

1.4 Rostlinné polyfenoly

Rostlinné polyfenoly jsou přírodní látky přítomné ve všech potravinách rostlinného původu. Celosvětový zájem v oblasti lidské výživy přinesl obraz složitých metabolických drah těchto látek v lidském organismu, avšak stále ještě neumožňuje odhalit spolehlivě biologické účinky, jež by nám vysvětlily preventivní vztah rostlinných polyfenolů k neinfekčním chronickým chorobám. Nicméně epidemiologické studie potvrzují, že nutričně vyvážená strava by měla zahrnovat pravidelný a dostatečný příjem vhodných typů polyfenolů [Zloch a Kladnická 2018].

1.5 Tuková tkáň

Tuková tkáň je komplexní, heterogenní a vysoce dynamický orgán zajišťující zásobu energie a přispívající k řízení energetického metabolismu celého organismu [Heindel et al.

2015]. Skládá se ze specifických buněk – zralých adipocytů, které se během adipogeneze (neboli diferenciaci adipocytů) pod endokrinními stimuly diferencují od svých prekurzorů mesenchymálních kmenových buněk.

Proces diferenciaci adipocytů probíhá v různých fázích vývoje organismu a je řízen jak nutričními faktory, tak i genetickými a environmentálními faktory.

Podle morfologie a funkce převládajících zralých adipocytů jsou u lidí rozpoznávány tři typy tukové tkáně: bílá (WAT), hnědá (BAT) a béžová (BEIGE/BRITE) tuková tkáň. WAT obsahuje adipocyty s jedinou velkou uniloculární kapénkou (vakuolou) lipidů, která vyplňuje většinu cytoplazmy a tlačí jádro a orgány včetně menšího počtu mitochondrií k okrajům buněk. BAT je charakterizována menšími adipocyty s množstvím menších lipidových kapének a mnoha mitochondriemi. Třetí typ BRITE, představuje kombinaci atributů předchozích dvou. Béžové adipocyty jsou střední velikosti, mají více lipidových kapének a méně mitochondrií, než adipocyt z BAT. Předpokládá se, že adipocyt WAT může být pod termogenními podněty přeměněn na béžový adipocyt [Cedikova et al. 2016].

Zralé adipocyty jsou schopny pod neuroendokrinní kontrolou ukládat energii do lipidových kapének ve formě triglyceridů a uvolňovat ji v chemické (WAT) nebo tepelné (BAT) formě podle požadavků organismu. Zbývající buňky tukové tkáně jsou tvořeny tzv. stromální vaskulární frakcí, do které patří imunitní, epitelální, vaskulární a stromální buňky. Kromě ukládání a distribuce energie se tuková tkáň podílí na regulaci systémového energetického metabolismu sekrecí adipokinů, cytokinů a chemokinů, které zprostředkovávají endokrinní, parakrinní, autokrinní a cross-talk komunikaci s jinými buňkami, tkáněmi a orgány. Fyziologická produkce adipokinů vyžaduje intaktní buněčný aparát zralých adipocytů, zejména mitochondriální dýchání a rovnováhu mezi lipogenezí a lipolýzou. Jelikož hormony regulují fyziologii těchto systémů, jejich působení může být narušeno chemickými látkami z prostředí, které napodobují, moduluji nebo blokují normální endokrinní funkce [Heindel et al. 2015].

Dysregulace adipokinů způsobená obezitou přispívá k patogenezi různých metabolických a kardiovaskulárních poruch [Ouchi 2016].

2 Hypotéza studie

Tato studie se zaměřila na vliv xenobiotik na lidský organismus. Navazujeme na studie, které obecně ukázaly spojitost mezi expozicí xenobiotik, a to konkrétně obezogenů, a zvětšením tělesné hmotnosti u lidí. Výsledky se liší dle typu chemické látky, úrovně expozice, načasování expozice a pohlaví jedince.

Působení obezogenů bylo původně kontroverzní, ale v současnosti se jedná o studiem ověřený fakt. Souhrnně lze říci, že obezogeny zvyšují adipogenezi a ukládání tuků, mění mechanismy regulující chuť k jídlu a pocity sytosti a působí jako endokrinní disruptory (zasahují do hormonálních regulací a mohou je pozměňovat) a podporují adipogenezi a obezitu u zvířat i lidí [La Merrill a Birnbaum 2011].

Účinky obezogenů se mohou projevit až později v životě, proto se naše studie zaměřila na dlouhodobou expozici vybraným polutantům během diferenciaci buněk z mezenchymálních kmenových buněk do zralého adipocytu ve vybraných dnech 0, 4, 10 a 21, kdy jsme prováděli měření ovlivněných a neovlivněných buněk. V předchozích studiích byly identifikovány obezogeny, které mají potenciál narušit četné metabolické signální dráhy ve vyvíjejícím se organismu, což může následně vést k trvalým změnám ve fyziologii dospělých. Tyto studie ukázaly, že prenatální nebo perinatální expozice chemikáliím narušujícím endokrinní systém obezity předurčuje organismus k ukládání většího množství tuku od začátku svého života [Braun et al. 2016; Liu et al. 2018]. To znamená, že lidé či zvířata, kteří byli vystaveni obezogenům chemikáliím během citlivého období vývoje, mohou být předem naprogramováni k ukládání zvýšeného množství tuku, což vede k celoživotnímu boji o udržení zdravé hmotnosti [Janesick et al. 2014]. V tomto případě samotné obezogeny nezpůsobují obezitu u lidí, ale mohou hrát důležitou zázemní roli při přibírání na váze v důsledku vývojového programování kontroly tukové tkáně, nutričně nevyváženého příjmu stravy a metabolismu [Janesick a Blumberg 2016].

3 Cíle práce

Zkoumání vlivu xenobiotik na lidský organismus představuje rozsáhlou oblast výzkumu. V této práci jsme se zaměřili na konkrétní sledování vlivu vybraného typu xenobiotika 2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1-dichlorethylenedichlorodiphenyldichloroethylenu (p, p'- DDE) na lidské mezenchymální kmenové buňky v průběhu jejich diferenciaci do maturovaných tukových buněk, adipocytů. V první fázi byla provedena pilotní studie ke zjištění běžné fyziologie diferencujících se lidských mezenchymálních kmenových buněk, odvozených z tukových buněk, do zralého adipocytu. Měření jsme prováděli ve dnech 0, 4, 10 a 21. den. Během diferenciačního procesu se v těchto dnech zjišťovala jejich proliferace a životaschopnost, kvantifikace akumulace lipidů v maturujících buňkách, kvalitativní a kvantitativní analýza mitochondrií, kdy se určilo mitochondriální dýchání buněk pomocí respirometrie s vysokým rozlišením a hodnotil se potenciál mitochondriální membrány. Buněčná diferenciaci je stimulována aktivací signálních drah na buněčné úrovni, které jsou následně převedeny do specifických procesů, jako je genová exprese, aktivace či inaktivace transkripčních faktorů a buněčných signálních proteinů. Diferencovaná buňka prochází řadou morfologických změn.

Po této pilotní studii jsme provedli studii vlivu p,p'-DDE v koncentracích 0,1 μM a 10 μM , a to v kombinaci čisté diferenciační médium (DM); diferenciační médium s dimethylsulfoxidem (DMSO); diferenciační médium s DMSO a p,p'-DDE, v konečné koncentraci 1 μM (DDE 1 μM); diferenciační médium s DMSO a p,p'-DDE, v konečné koncentraci 10 μM (DDE 10 μM).

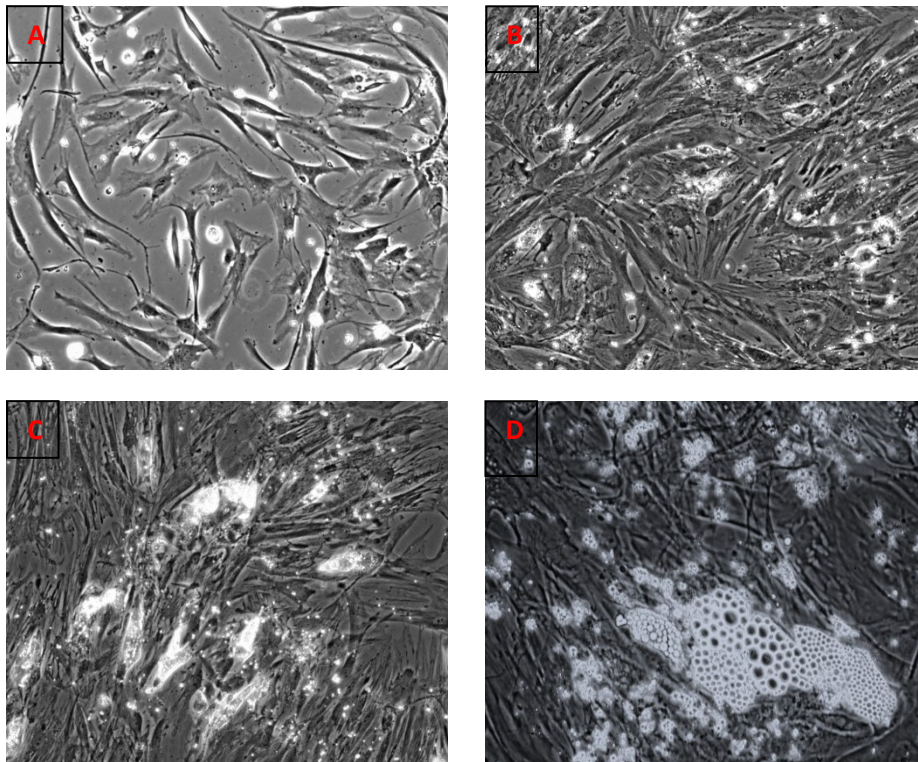
4 Materiál a metody

Buněčná kultura a diferenciac

Mezenchymální kmenové buňky odvozené z lidské tukové tkáně (hADMSC's), izolované od ženské dárkyně z podkožní tukové tkáně charakterizované průtokovou cytometrií, byly zakoupeny od Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Buňky byly nasazeny v množství 1×10^5 buněk na 1 cm^2 a kultivovány v Petriho miskách (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko) v komerčně dostupném kultivačním médiu MesenPRO RS™ Medium doplněné o MesenPRO RS™ s růstovým doplňkem se sníženou sérovou hladinou (2 %), 1 % L-glutaminu a 1 % gentamicinu (vše Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Po dosažení 80% konfluenc hADMSC byly buňky kultivovány pro adipogenní diferenciaci v kultivačních miskách 96, 24, 12 a 6 well plate (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko). Diferenciační médium bylo připraveno podle pokynů výrobce a obsahovalo StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal médium (DM) s adipogenním StemPro® doplňkem a 1% gentamicinem (vše Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Po dosažení 80% konfluenc bylo kultivační médium vyměněno za 4 různá diferenciační média: čisté diferenciační médium (DM); diferenciační médium s dimethylsulfoxidem (DMSO); diferenciační médium s DMSO a p,p'-DDE, v konečné koncentraci $1 \mu\text{M}$ (DDE $1 \mu\text{M}$); diferenciační médium s DMSO a p,p'-DDE, v konečné koncentraci $10 \mu\text{M}$ (DDE $10 \mu\text{M}$). Čisté diferenciační médium obsahovalo StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal médium (DM) s adipogenním StemPro® doplňkem a 1% gentamicinem (vše Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

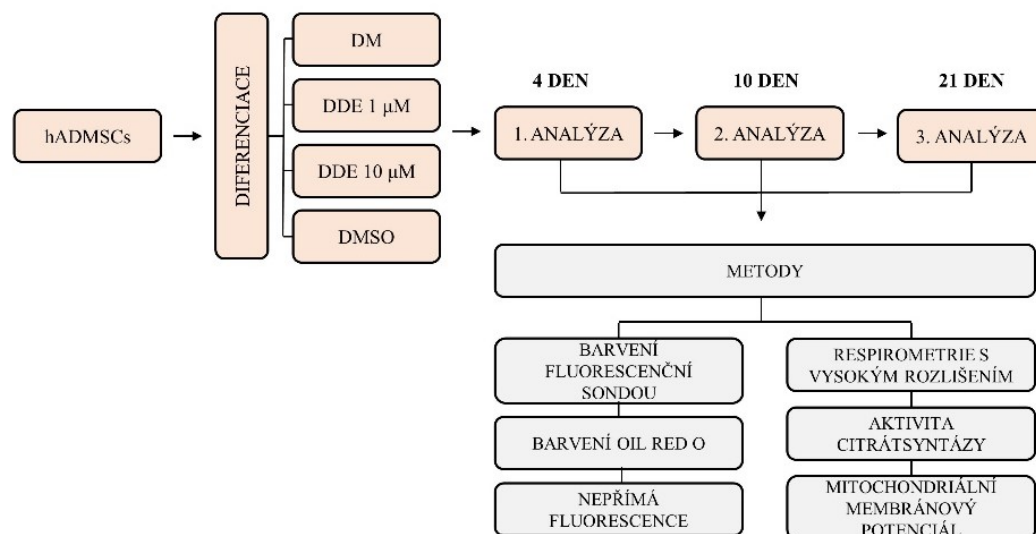
Koncentrace $1 \mu\text{M}$ DDE využita v in vitro pokusu odpovídá lidské expozici [Achour et al. 2017; Jimenez Torres et al. 2006; Malarvannan et al. 2013].



Obrázek 2 - Mikroskopické zobrazení průběhu diferenciaci MSC buněk do adipocytů

Legenda: A. Den 0 - buňky při 70 % konfluenci, počátek diferenciaci; B. Den 4- začátek vzniku tukových vakuol; C. Den 10 – postupný nárůst tukových vakuol; D. Den 21 – diferencované adipocyty.

Médium bylo měněno každé 3 dny až do celkové inkubační doby 21 dní. Buňky byly kultivovány a diferencovány ve zralé adipocyty pod atmosférou 5 % CO₂ při teplotě 37 °C.



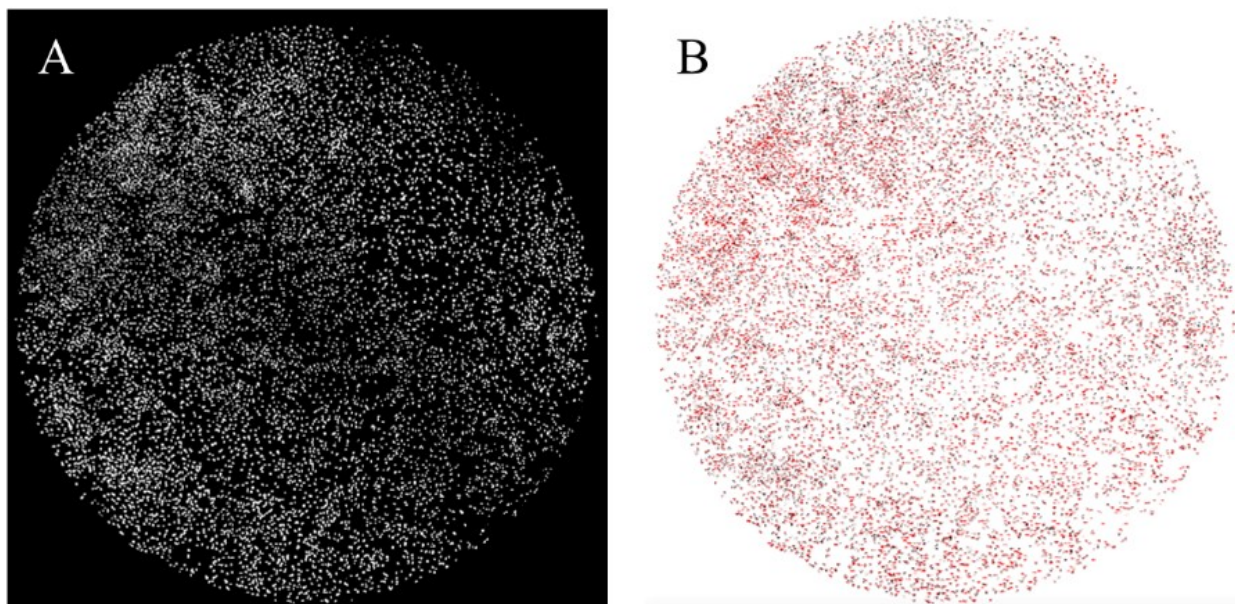
Obrázek 3 - Souhrnné schéma experimentu [Kladnicka et al. 2021]

Legenda: DM: čisté diferenciační médium; DDE 1 μM : diferenciační médium s přidáním p,p'-DDE v koncentraci 1 μM , které bylo rozpuštěné v DMSO; DDE 10 μM : diferenciační médium s přidáním p,p'-DDE v koncentraci 10 μM , které bylo rozpuštěné v DMSO, DMSO: diferenciační médium (DM) pouze s DMSO.

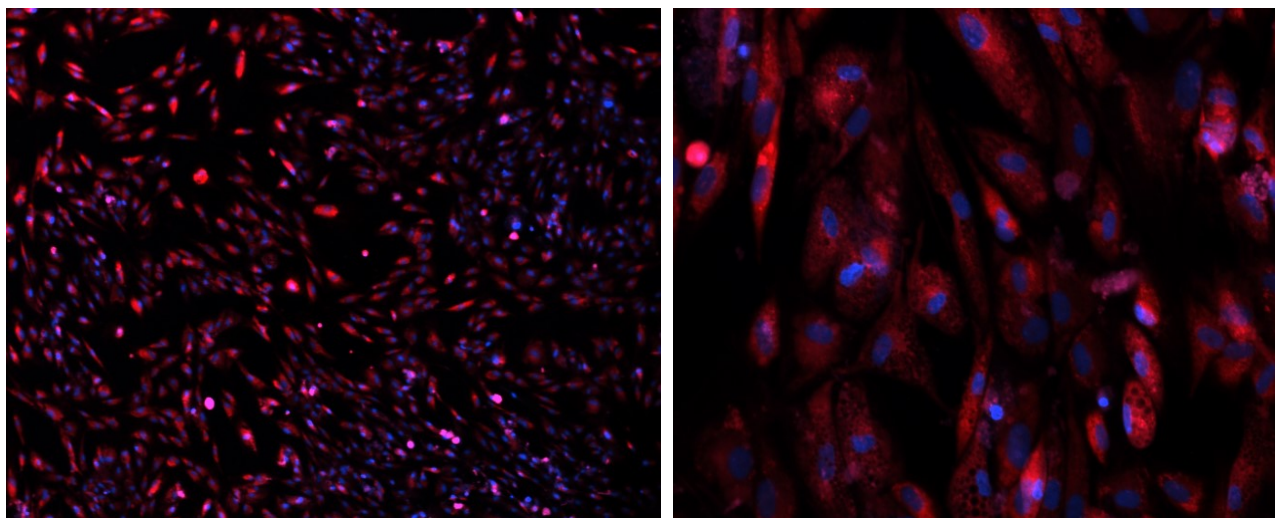
Buněčná proliferace

Lidské kmenové buňky odvozené z tukové tkáně byly nasazeny v množství 5000 buněk na 1 cm^2 , tzn. 2000 buněk na jamku na dno 96 dark well plate (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) a ošetřeny, viz výše. Vzorky byly označeny ve dnech 0, 4, 10 a 21 pomocí činidla NucBlue[®] Live ReadyProbes[®] (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). NucBlue[®] (DAPI) se připravuje dle návodu 2 kapky NucBlue[®] na 1 ml Live cell média (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ohřátého na pokojovou teplotu. Takto připravený roztok se přenesl v množství 100 μl na 1 propláchnutou jamku 96 well plate a roztok se nechal působit 15 minut. Oplach byl prováděn ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem (PBS).

Všechny vzorky byly naskenovány pomocí Olympus IX83 (Olympus, Tokio, Japonsko) vybaveného systémem VisiScope Live Cell Imagine při 100x zvětšení. Obrázky byly analyzovány pomocí softwaru ImageJ (FIJI), viz obrázek 4.



Obrázek 4 - Ilustrativní dokumentace analýzy počtu jader v programu ImageJ (FIJI)



Obrázek 5 – Adipocyty v 21. den diferenciacie

Legenda: Zobrazení pomocí fluorescenčního barviva: červená barva – mitochondrie, modrá barva – jádro

DAPI (4',6-diamidin-2-fnylindol) je fluorescenční barvivo. DAPI se váže nejsilněji na úseky DNA bohaté na AT (adenin, thymin), kde se váže v poměru 1 molekula DAPI na 3 AT-páry. DAPI se pro svou silnou fluorescenci a schopnost procházet buněčnou membránou běžně používá ve fluorescenční mikroskopii pro obarvení buněčných jader. Po vazbě DAPI na DNA se až 20x zesiluje intenzita fluorescence, protože nedochází ke zhášení fluorescence molekulami vody v roztoku. Při vazbě na dvouvláknovou DNA má DAPI

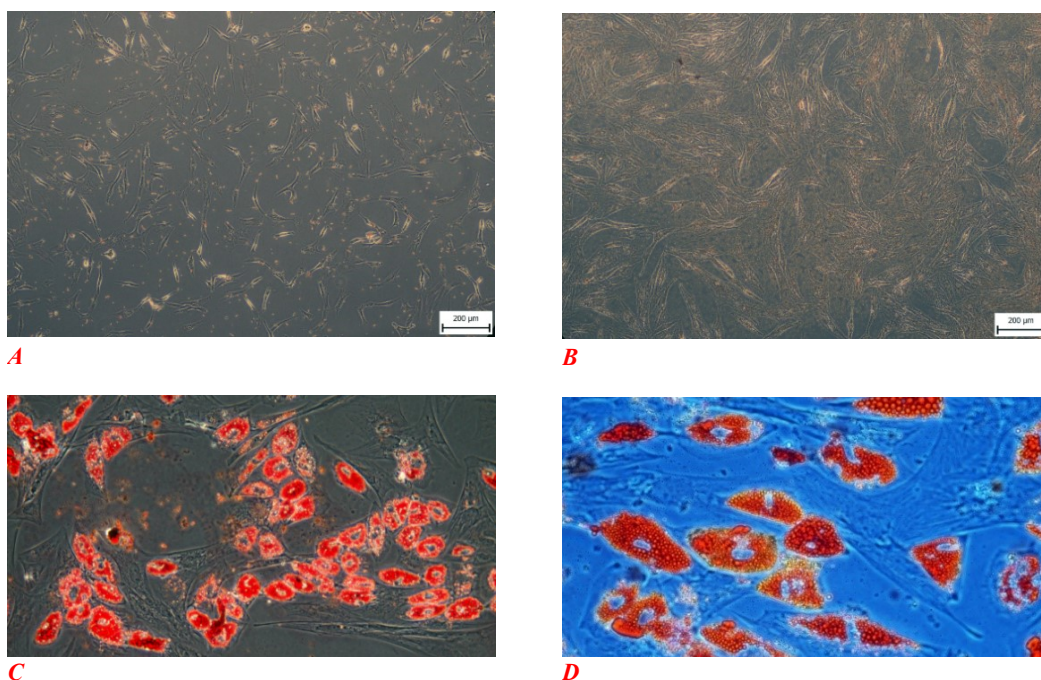
excitační maximum při 358 nm (ultrafialové světlo) a emisní maximum při 461 nm (modré světlo), viz obrázek 5 [Kapuściński a Szer 1979; Kapuscinski 1995].

Buněčná životaschopnost

PrestoBlue™ je činidlo pro zjištění životaschopnosti a proliferace buněk (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Činidlo využívá mitochondriální aktivitu k redukcí nefluorescenčního modrého resazurinu na fluorescenční růžový resofurin. Činidlo PrestoBlue™ bylo přidáno v množství 10 µl k buňkám s 90 µl kultivačního média na 96 dark well plate (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Buňky byly inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C. Byla měřena bottom-read fluorescence a odečítána při 560 nm (excitace) a 590 nm (emise) pomocí zařízení mikroplate reader Synergy™ HT (BioTek, Winooski, VT, USA).

Barvení olejovou červení O

Lidské kmenové buňky odvozené z tukové tkáně byly obarveny pomocí roztoku Oil Red O, který barví intracelulárně triglyceridové kapénky, viz obrázek 6. Po odstranění média byly buňky dvakrát promyty ve fosfátovém pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) a fixovány v 4% formaldehydu připraveném v PBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly buňky promyty dvakrát v destilované vodě a obarveny v roztoku Oil Red O. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 0,5 g Oil Red O prášku (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ve 100ml isopropanolu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Roztok byl přefiltrován filtračním papírem a zamíchán v poměru 3:2 – tři díly 0,5% roztoku Oil Red O a dva díly destilované vody. Buňky byly inkubovány po dobu 15 minut s roztokem Oil Red O při pokojové teplotě, následně dvakrát promyty v destilované vodě, aby se odstranilo nenavázané barvivo a buňky pak byly vizualizovány pomocí invertovaného mikroskopu Olympus CX41 (Olympus, Tokio, Japonsko) připojenému k digitálnímu fotoaparátu.



Obrázek 6 - Adipocyty během diferenciace barvené olejovou červení O

Legenda: A-D: Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) se akumuluje v tukových vakuolách adipocytů. Fixované a obarvené buňky byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX41 (zvětšení 10x (A, B), 20x (C), 40x (D)). A. Den 0 - mesenchymální kmenové buňky; B. Den 4 – diferencované MSC; C. Den 10 – diferencované MSC, D. Den 21 - maturované adipocyty.

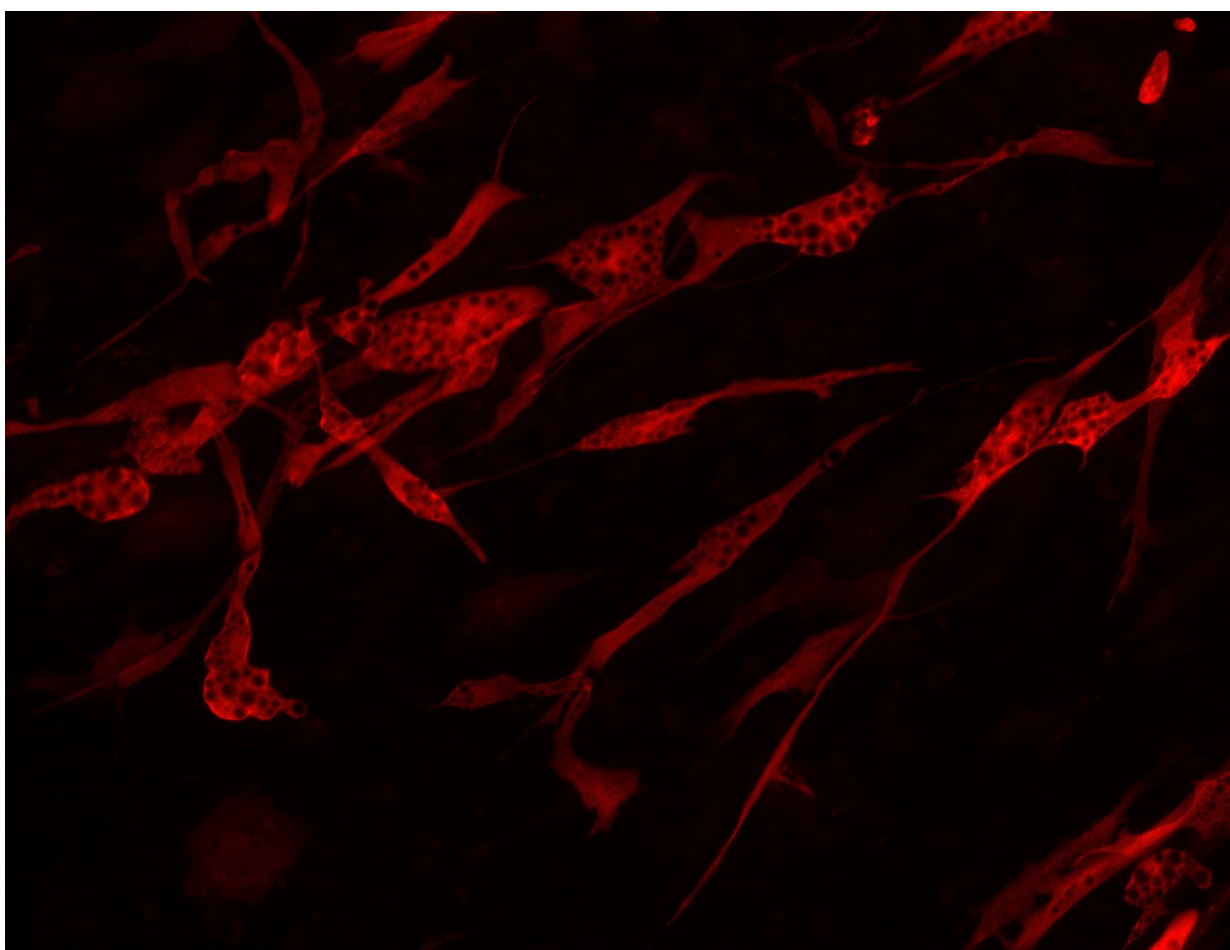
Kvantifikace akumulace lipidů

Akumulace lipidů byla měřena pomocí Oil Red O extrakce lýzou a mírným třepáním po dobu 10 min při pokojové teplotě. Použili jsme 4 % NonidetTMP-40 (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) ve 100% isopropanolu jako lyzačním pufrem. Extrakt (100 μ l) byl přenesen do 96 jamkové destičky. Absorbance byla měřena při 490 nm pomocí mikroplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA).

Nepřímá imunofluorescence - Fatty Acid-Binding Protein 4

Fatty acid binding protein 4 (FABP 4) je vysoce exprimován v adipocytech a cca 1 % všech proteinů v tukové tkáni je tvořeno FABP 4, proto je využívám jako marker zralých adipocytů v tukové tkáni. Buňky byly promyty v PBS2, fixovány po dobu 60 minut 4% formaldehydem s PBS při pokojové teplotě a permeabilizované v PBS obsahujícím 0,3 %

Triton X-100 po dobu 15 minut s následnou blokací v PBS s 1 % sérovým albuminem (BSA) a 10% normálním oslím sérem při pokojové teplotě po dobu 60 min. Poté byly buňky inkubovány s protilátkou proti mastné kyseliny vázajícímu proteinu 4 (FABP4; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) v pracovním roztoku (PBS obsahující 0,03 % Tritonu X-100, 1 % BSA, 10 % normální oslí sérum a antiFABP4 v konečné koncentraci 10 µg/ml) přes noc při 2-8 °C. Po třech 5-minutových opláchnutích v PBS s 1 % BSA byly buňky inkubovány po dobu 1 hodiny v oslím anti-kozím séru sekundárně konjugovanou protilátkou IgG NorthernLights™ NL557 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) zředěnou 1:200 v 1% BSA v PBS ve tmě po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Krycí sklíčka byla omyta, umístěna na mikroskopická sklíčka s médiem (ProLong Gold AntifadeMountant s DAPI, molekulární sondy, Eugene, OR, USA) a vizualizována fluorescencí mikroskopem Olympus CX41 (Olympus, Tokio, Japonsko) připojeném k digitálnímu fotoaparátu, viz obrázek 7.



Obrázek 7 - Adipocyty v 21. den diferenciace

Legenda: Potvrzení přítomnosti adipocytů pomocí fatty acid binding protein 4, vizualizováno fluorescenčním mikroskopem při 200 x zvětšení.

Kvalitativní a kvantitativní analýza mitochondrií

1. Barvení fluorescenční sondou

Fluorescenční sondy, MitoTrackerTM Red CMXRos a činidlo NucBlue[®] Live ReadyProbes[®] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zobrazují mitochondrie a jádra. Označení mitochondrií se provádí inkubováním buněk s MitoTrackerTM, který pasivně difunduje přes plazmatickou membránu a hromadí se v aktivních mitochondriích. Jaderné kontrastní barvivo je propustné pro buňky NucBlue[®] Live ReadyProbes[®]. Činidlo obsahuje barvivo Hoechst[®] 33342 (2'-[4-ethoxyfenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) emitující modrou fluorescenci, když je navázán na DNA s emisním maximem při 460 nm a to je detekováno přes modrý/azurový filtr. Kultivační médium bylo nahrazeno živým zobrazovacím roztokem (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Dvě kapky činidla NucBlue[®] Live ReadyProbes[®] byly přidány na mililitr média a MitoTrackerTM byl přidán v konečné koncentraci 100 nM. Buňky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut a poté vizualizovány pomocí kamery Hamamatsu Orca-ER namontované na inverzní mikroskop Olympus IX 81 při 200× zvětšení (Olympus, Tokio, Japonsko).

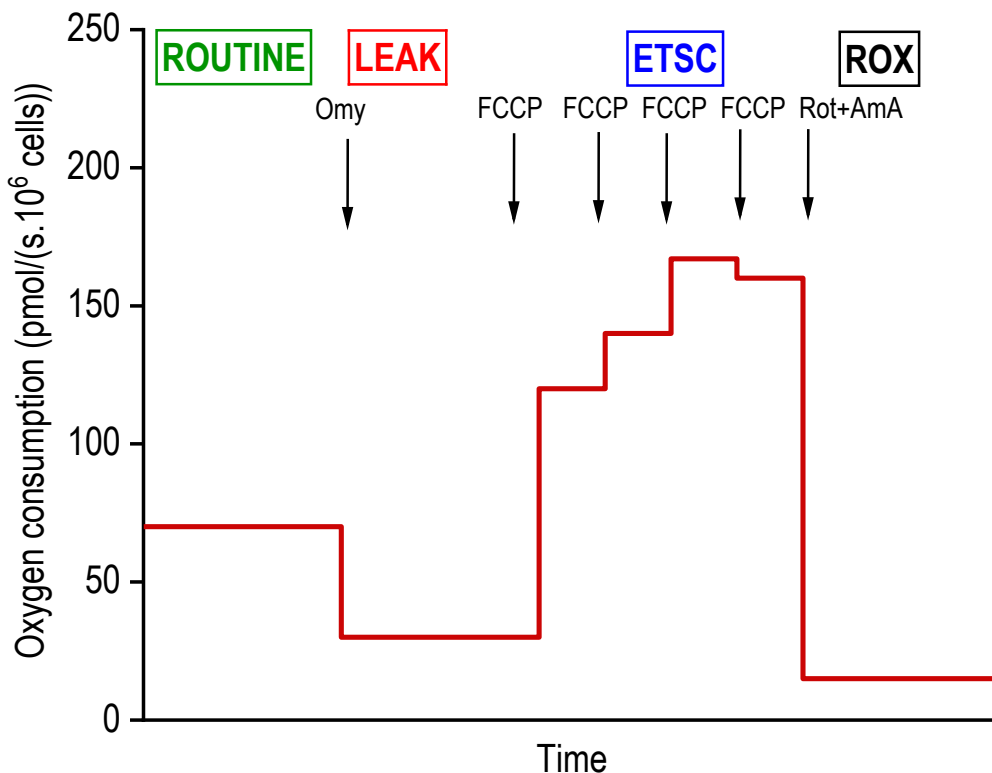
2. Respirometrie s vysokým rozlišením

Analyzovali jsme mitochondriální respiraci intaktních adipocytů ve 0., 4., 10. a 21. den diference (vždy $n = 6$ pro každou skupinu, tj. DM, DMSO, DDE 1 μM , DDE 10 μM). K měření mitochondriálního dýchání intaktních buněk byl použit přístroj oxygraf Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko) připojený k počítači se Softwarem DatLab pro sběr a analýzu dat (Oroboros, Innsbruck, Rakousko). Kyslíkový tok byl vypočten jako záporná derivace času koncentrace kyslíku ve 2 ml skleněných komůrkách při 37 °C. (Pesta a Gnaiger 2012) Kalibrace oxygrafických komor probíhala v přítomnosti StemPro[®] Adipogenesis diference média, které se míchalo při 350 otáčkách za minutu a ekvilibrovalo se vzduchem 60 min. Adipocyty byly injikovány do komůrek za použití Injekční stříkačky Hamilton[®] a respirační aktivita intaktních buněk byla hodnocena jako spotřeba kyslíku ve fyziologickém spřaženém stavu (ROUT; R). Pak, nefosforylující stav LEAK (L; spotřeba kyslíku potřebná pro kompenzaci transportu elektronů pro únik protonů přes vnitřní

mitochondriální membránu) byla indukována přidáním oligomycinu (2,5 $\mu\text{mol/l}$), inhibitor ATP-syntázy. Maximální kapacity systému přenosu elektronů (stav ETSC; E), bylo dosaženo po titraci trifluorkarbonylkyanidfenylhydrazonu (FCCP; titrační kroky 0,05 $\mu\text{mol/l}$). Spotřeba kyslíku byla poté inhibována inhibitorem komplexu III antimycin A (2,5 $\mu\text{mol/l}$) k dosažení zbytkové spotřeby kyslíku (ROX). Spotřeba kyslíku byla vyjádřena v $\text{pmol O}_2/(\text{buňky s.}10^6)$ a korigována na ROX a instrumentální zázemí [Chen et al. 2009]. Reprezentativní schéma experimentu pro intaktní buňky je znázorněno na obrázku 8.

Dále byly vypočítány další kontrolní parametry: L/E poměr spřažení (L/E coupling control ratio) jako ukazatel od-/rozspřažení, poměr R/E (R/E control ratio) ukazující spotřebu kyslíku ve spřaženém stavu ve vztahu ke kapacitě přenašečového systému, E-R rezervní kapacita odrážející rozdíl mezi nespřaženou a spřaženou respirací, R-L neboli čistá obvyklá/rutinní kapacita vztažená k buněčné produkci ATP.

Buňky byly spočítány pomocí Bürkerova hemocytometru (průměrný počet buněk byl $\sim 4 \times 10^5$ buněk na komoru).



Obrázek 8 - Zobrazení souhrnného schéma experimentu [Kladnicka et al. 2021]

Legenda: Design titračního protokolu pro měření spotřeby mitochondriálního kyslíku u intaktních diferencujících se adipocytů. Podrobněji popsáno v kapitole Metody.

3. Aktivita citrát syntázy

Bylo provedeno stanovení aktivity citrát syntázy používané k odhadu mitochondriálního obsahu ve vzorcích z každé kyslíkové komory. 200 μ l obsahu smíšené a homogenizované komory bylo přidáno do 800 μ l testovacího média obsahujícího 0,1 mmol/l kyseliny 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoové), 0,25 % Triton-X, 0,5 mmol/l oxalacetátu, 0,31 mmol/l acetyl koenzymu A, 5 μ mol/l EDTA, 5 mmol/l triethanolaminu hydrochloridu a 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 8,1 [Kuznetsov et al. 2002]. Enzymová aktivita byla měřena spektrofotometricky při 412 nm a 30 °C více než 200 s a vyjádřena v mIU na 10⁶ buněk.

4. Mitochondriální membránový potenciál

Mitochondriální membránový potenciál byl měřen pomocí mitochondriální membrány JC-1 Potential Assay Kit (Mitosciences, Abcam, Cambridge, UK). Buňky byly nasazeny v množství 1×10^5 na 1 cm^2 buněk do tmavé destičky a kultivovány, jak bylo vysvětleno dříve. Mitochondriální membránový potenciál byl hodnocen ve dnech 0 (n=12), 4 (n=12), 10 (n=12) a 21 (n=12) diferenciaci. Buňky byly jednou promyty PBS a inkubovány s JC-1 ($1 \mu\text{M}$) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 min. Pak byly buňky dvakrát promyty a analyzovány fluorescencí spektrofotometricky (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA) při excitaci 475 nm a emisi 530/590 nm. Změny v mitochondriálním membránovém potenciálu byly také analyzovány průtokovým cytometrem (FACSCanto II; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Byl použit roztok JC-1 ($10 \mu\text{l}$ o koncentraci $200 \mu\text{M}$), který byl přidán k buněčné suspenzi (1 ml) a buňky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 25 minut. Následovalo promytí PBS a po inkubaci následovala centrifugace (1500 ot. /min. ; 5 min.). Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v $500 \mu\text{l}$ PBS a ihned měřena na průtokovém cytometru. Intenzita poměru červené/zelené fluorescence byla stanovena pro hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu.

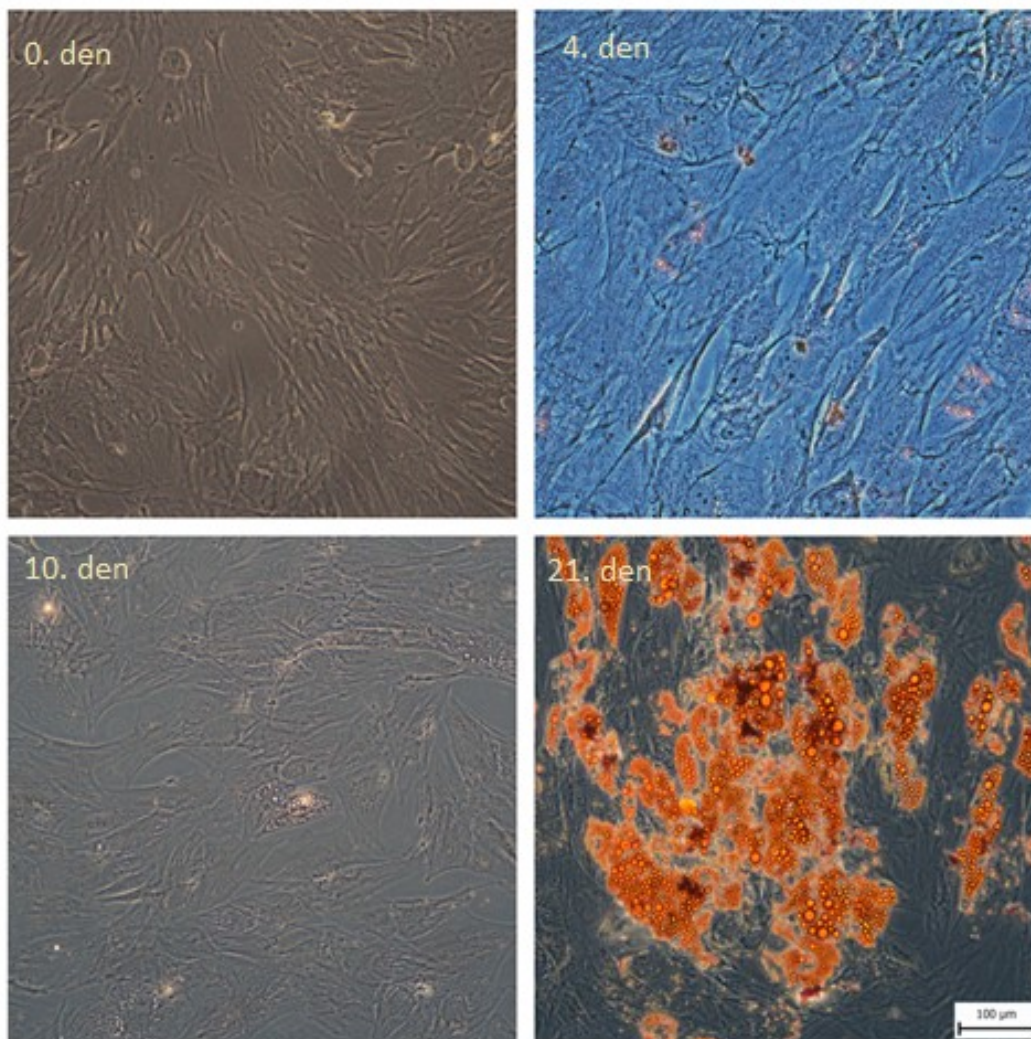
Analýza dat a statistika

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru MATLAB statistic Toolbox (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) a OriginPro 2017 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). Po testování na normální rozdělení (Shapiro Wilk test), byla normálně distribuovaná data porovnána pomocí dvou-faktorové analýzy rozptylu ANOVA a následně Tukeyho post hoc testem. Nenormálně rozdělená data byla před analýzou logaritmičsky transformována. Dále rozdíl mezi skupinami, které vyžadovaly transformaci nebo data, která nemohla dosáhnout normální distribuce, byla analyzována pomocí Wilcoxon rank-sum a Friedmanova statistického testu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány jako hladina významnosti.

5 Výsledky studie

Buněčná kultura a diferenciac

Lidské kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (hADMSC's) byly udržovány a kultivovány do diferencovaných adipocytů za standardních podmínek po dobu 21 dnů. Buňky sklizené v den 0 byly mezenchymální kmenové buňky s typickým fibroblastickým tvarem vřetene s několika ostruhami a velkým jádrem. Během adipogenní diferenciac se buněčná morfologie změnila - buňky postupně zvětšovaly svůj objem, začaly se objevovat malé tukové vakuoly a postupně se zvětšovaly, viz obrázek 9. Během diferenciac byl pozorován nevýznamný nárůst obsahu tuku v buňkách a poté mezi 10. a 21. dnem se výrazně zvýšila akumulace tuku, což odpovídalo rostoucímu množství naměřeného barvení Oil Red O. Trend ke zvýšení počtu buněk byl pozorován těsně po indukci diferenciac.



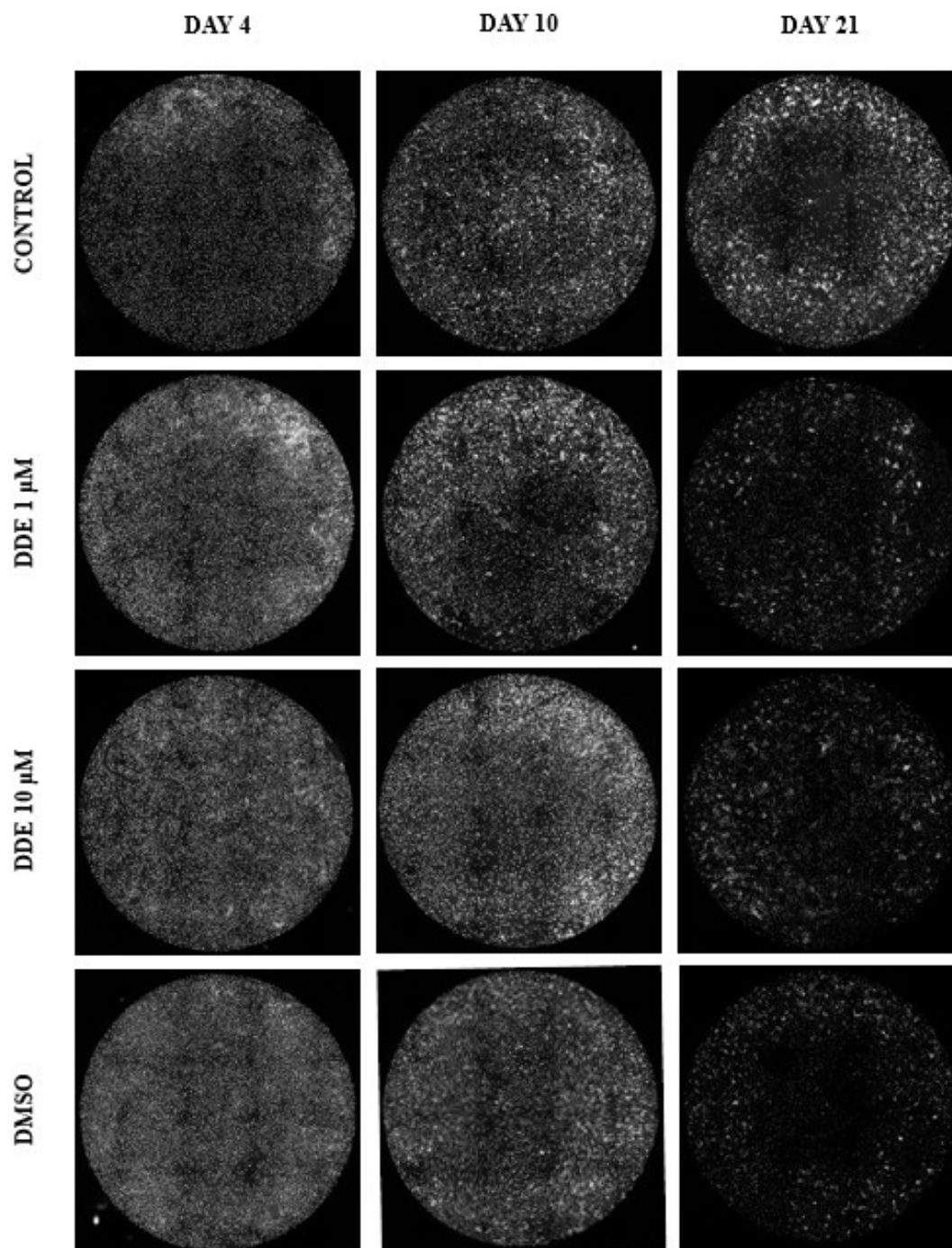
Obrázek 9 - Neovlivněné lidské mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (hADMSC's) během adipogeneze

Legenda: Vizualizováno mikroskopicky při 100 μm ve dnech 0, 4, 10 adipogeneze a 21. den zralých adipocytů. Barvení Oil Red O.

Buněčná proliferace

U neovlivněných buněk byl pozorován trend zvýšení počtu buněk těsně po indukci diferenciaci (den 0 oproti dnu 4, $p=0,05004$) se statistickou významností den 0 oproti dnu 10 u DM. V pozdějším průběhu adipogeneze se mitotické dělení zpomalilo. To odpovídá našim dalším zjištěním, kdy je pozorována akumulace lipidů místo mitotického dělení ve druhé fázi diferenciaci.

Trend šíření u ovlivněných buněk je ve všech 4 prostředích (DM, DMSO, DDE 1 μM a DDE 10 μM) stejný. Na začátku diferenciace lze pozorovat vyšší mitotickou aktivitu a dochází ke zvýšení počtu buněk. Buňky postupně inhibují svoji mitotickou aktivitu a 21. den počet buněk klesá. DMSO je spojen se silnější inhibicí mitotické aktivity. V tomto prostředí došlo 21. dne ve srovnání s kontrolou k významnému poklesu proliferace ($p \leq 0,05$). DDE měl opačný účinek v obou studovaných koncentracích. Zde došlo k významnému zvýšení počtu buněk ve srovnání s prostředím složeným pouze z DMSO ($p \leq 0,05$).



Obrázek 10 - Proliferace ovlivněných buněk během adipogeneze

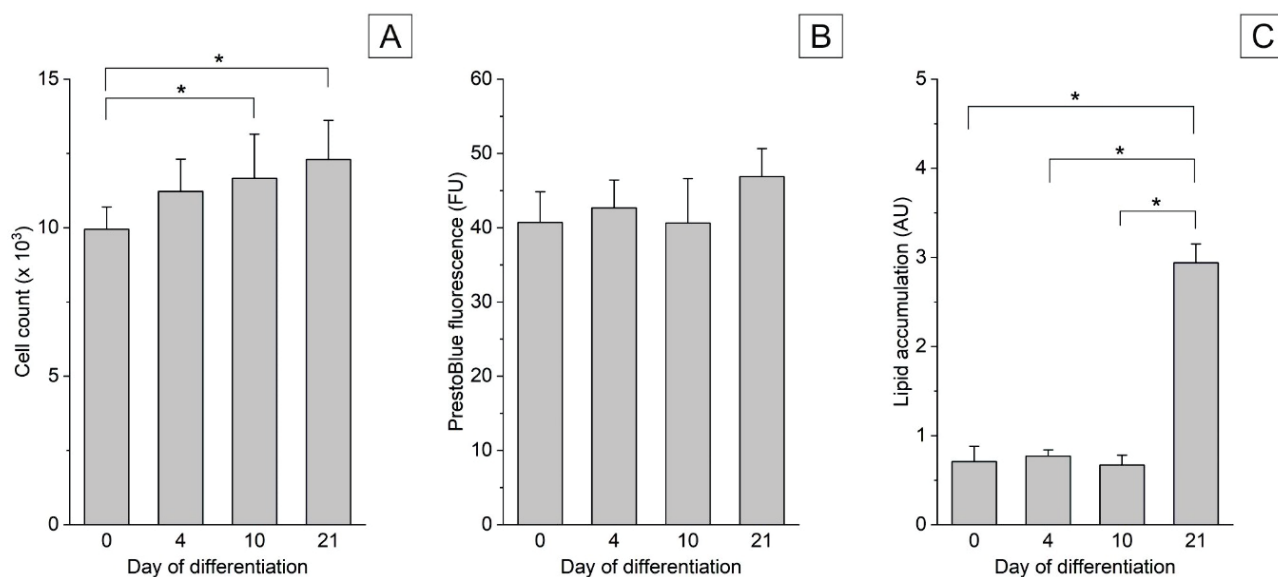
Legenda: Mikroskopická vizualizace a příklad množství jader v jednotlivých prostředích pomocí Olympus IX83 (Olympus, Tokio, Japonsko) vybaveného systémem VisiScope Live Cell Imagine při 100x zvětšení

Buněčná životaschopnost

Životaschopnost buněk jsme stanovili pomocí činidla PrestoBlue™, tato životaschopnost byla vyjádřena pomocí fluorescenčních jednotek (FU). Činidlo využívá mitochondriální aktivitu k redukci nefluorescenčního modrého resazurinu na fluorescenční růžový resazurin.

Během neovlivněné diferenciaci nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny (Obrázek 11).

U ovlivněných buněk došlo k statistické významnosti ve dnech 10 a 21 mezi DDE 10 μM a DDE 1 μM , kdy buňky vystavené nižší koncentraci polutantu vykazovaly vyšší životaschopnost.



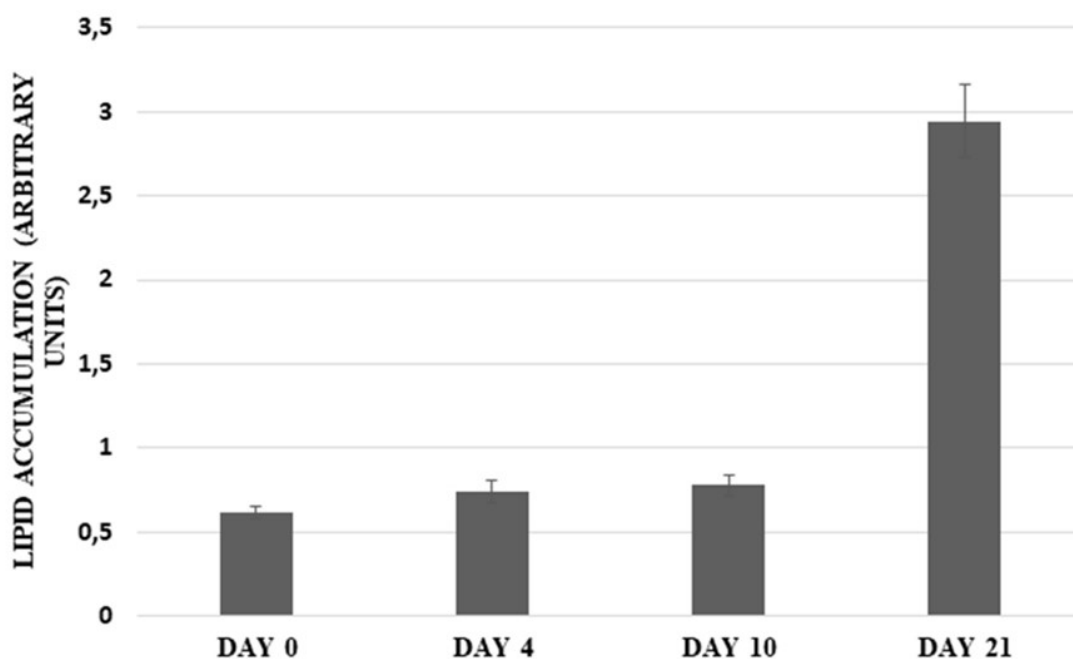
Obrázek 11 - Neovlivněná buněčná proliferace, životaschopnost a akumulace tuků v 0., 4., 10. a 21. den adipogeneze [Kladnická et al. 2019]

Legenda: (A) Buněčná proliferace (NucBlue®), (B) buněčná životaschopnost (PrestoBlue™) a akumulace tuků (Oil Red O) u neovlivněných adipocytů (DM) diferencujících se z lidských kmenových buněk odvozených z tukové tkáně ve dnech diferenciaci 0, 4, 10 a 21.

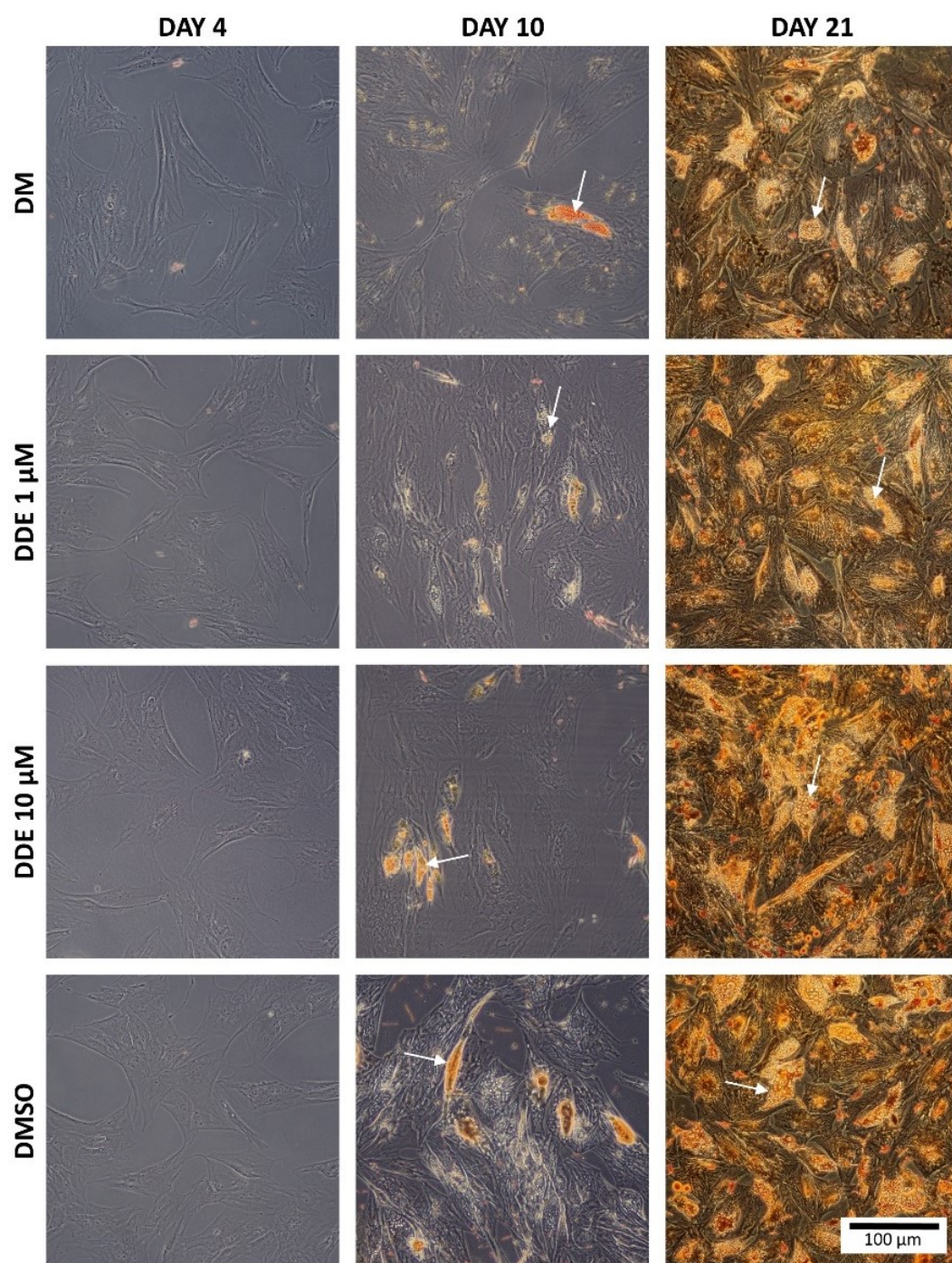
Kvantifikace akumulace lipidů a barvení olejovou červení O

Oil Red O byl použit k barvení adipocytů a vizualizaci tukových kapének. Oil Red O interaguje s lipidy za vzniku červeno-oranžového zbarvení. Během diferenciacce nebyl pozorován zvýšený obsah tuku v buňkách do dne 10, viz obrázek 12. Významné zvýšení akumulace tuku bylo pozorováno mezi dnem 10 a 21, které odpovídalo naměřeným hodnotám. Data jsou v souladu s našimi předchozími zjištěními, které dokazují, že v tomto období neprobíhá žádné významné mitotické dělení, ale spíše buňky získávají metabolický fenotyp specifický pro zralé adipocyty.

Kvantifikace akumulace lipidů byla měřena u ovlivněných buněk pouze v 21. den adipogeneze a výsledky byly bez statistické významnosti.



Obrázek 12 - Standardní ukládání lipidů z mezenchymálních kmenových buněk do zralého adipocytu ve 21. dnu



Obrázek 13 - Barvení olejovou červení O u ovlivněných hADMSC's během adipogeneze [Kladnicka et al. 2021]

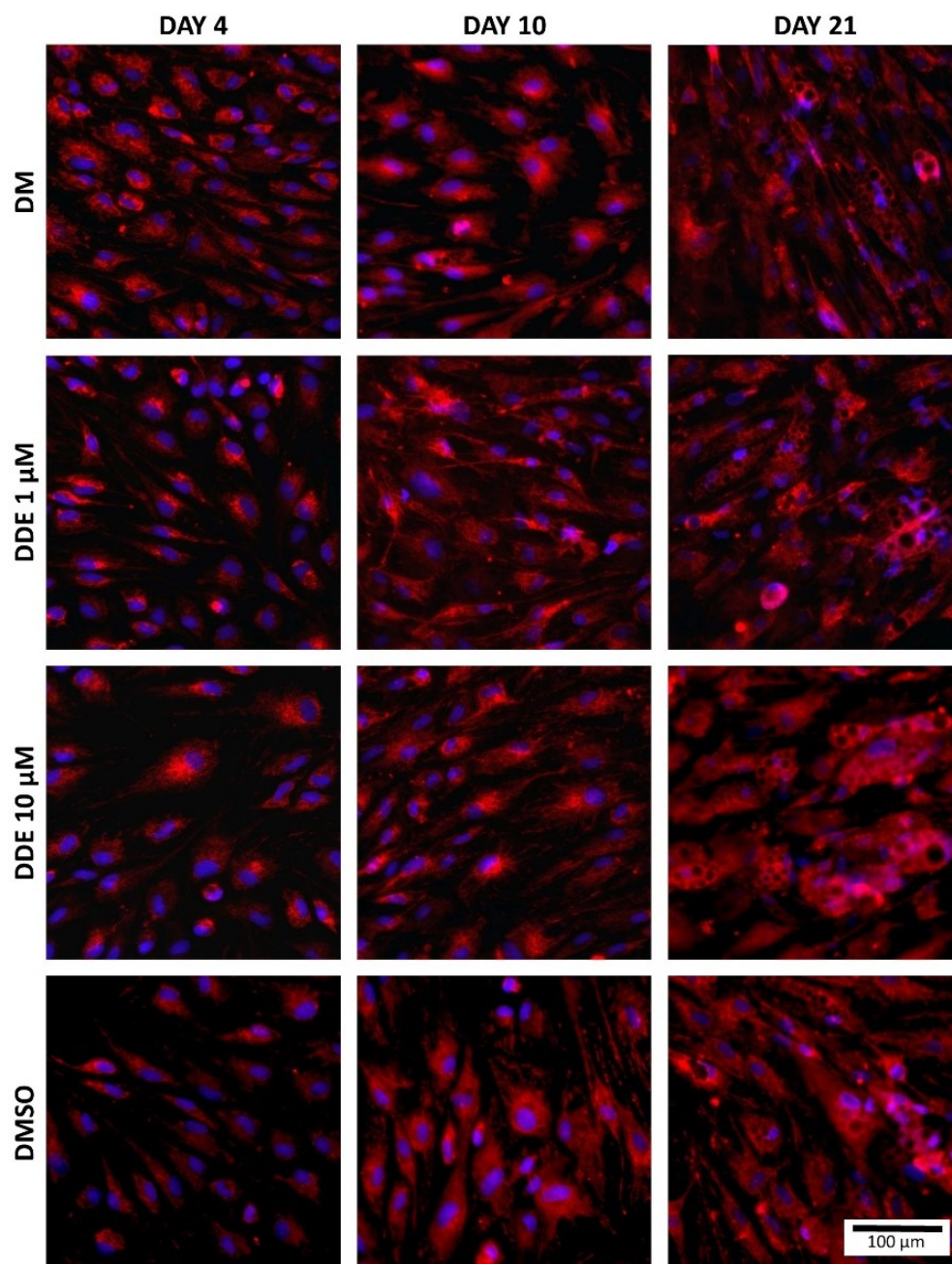
Legenda: Mikroskopická vizualizace a porovnání tuku v jednotlivých prostředích při zvětšení 100 μm. Šipky ukazují příklady tukových kapének.

Kvalitativní a kvantitativní analýza mitochondrií

1. Barvení fluorescenční sondou

K vizualizaci mitochondrií a jader bylo použito činidlo MitoTracker™ RedCMXRos a NucBlue™ Live ReadyProbes Reagent (obě Molecular Probes, Eugene, OR, USA). MitoTracker™ pasivně přechází do mitochondrií a hromadí se zde. NucBlue™ Reagent obsahuje Hoechst 33342 (20-[4-ethoxyfenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,50-bi-1H-benzimidazol), který emituje modrou fluorescenci, když je navázán na DNA.

U neovlivněných buněk fluorescenční mikroskopie ukázala, že během diferenciacie adipocytů došlo ke zvětšení objemu mitochondriálních sítí. Tyto údaje korespondovaly s výsledky stanovení aktivity citrátsyntázy. Na konci diferenciacie byla aktivita citrátsyntázy $92,7 \pm 33,5$ mIU/ 10^6 buněk a byla významně vyšší, než v den 4 ($17,9 \pm 4,5$ mIU/ 10^6 buněk). Tato data naznačují zvyšující se množství mitochondrií během diferenciacie.



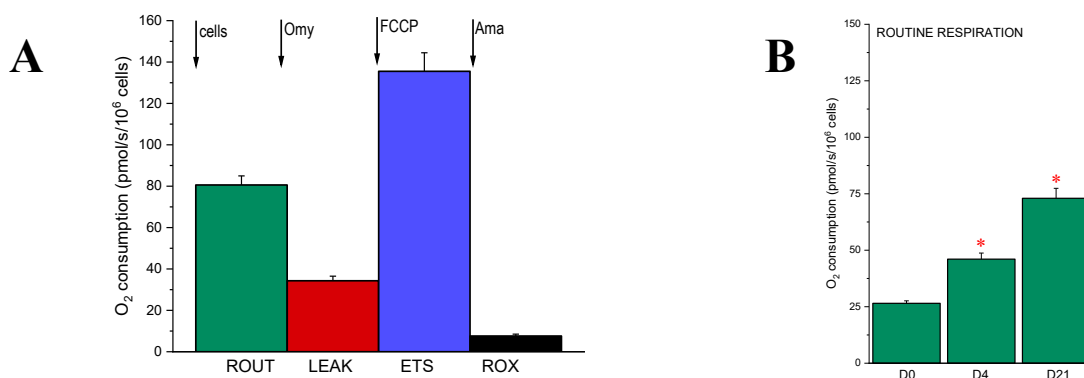
Obrázek 14 - Vizualizace ovlivněných a neovlivněných jader a mitochondrií během adipogeneze [Kladnicka et al. 2021]

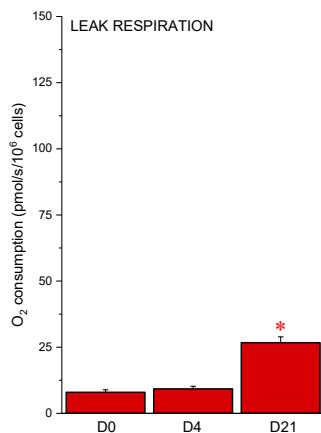
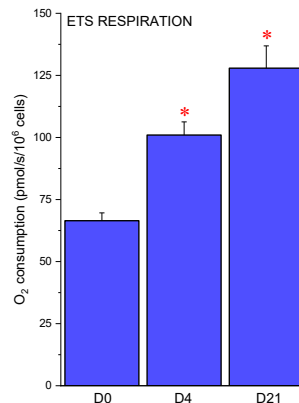
Legenda: K vizualizaci mitochondrií a jader byl použit MitoTracker™ RedCMXRos a NucBlue™ Live ReadyProbes Reagent. Mitochondrie vizualizovány červeně a jádra modře.

2. Respirometrie s vysokým rozlišením

V souladu s očekáváním vzrostla u kontrolních vzorků (DM a DMSO) mezi 4. a 10. dnem experimentu rutinní respirace o zhruba 30 %. Rozdíly nicméně nedosahovaly statistické významnosti (obrázek 15A). Naproti tomu rutinní spotřeba kyslíku pozorovaná v 10. den adipogeneze u vzorku 1 μM DDE byla vyšší ~50 %, než v den 4 ($p < 0,0001$) a stala se také významně odlišná také ve srovnání s 10 μM DDE. DDE 10 μM adipocyty nevykazovaly mezi dnem 4 a 10 adipogeneze zvýšení ve stavu ROUT. U buněk, které se diferencovaly pouze v kontrolních médiích (DM a DMSO), zůstala rutinní respirace téměř totožná ve 21. den. Buňky DDE 10 μM měly vyšší rutinní spotřebu kyslíku 21. dne ve srovnání se 4. dnem. V adipocytech diferencujících se v přítomnosti 1 μM DDE rutinní spotřeba kyslíku dále k 21. dni experimentu vzrostla a stala se statisticky významně odlišnou ve srovnání jak s DMSO, tak s DM kontrolami, viz obrázek 15B

Ve stavu LEAK, tj. spotřebě kyslíku po inhibici syntézy ATP oligomycinem, postupně rostl ode dne 4 do dne 21. U DDE 10 μM adipocytů, byla respirace ve stavu LEAK velmi podobná ve dnech 4 a 10 ($11,6 \pm 2,9$ a $10,1 \pm 3,2$ $\text{pmol/s} \cdot 10^6$ buněk) a poté vzrostla a dosáhla statisticky signifikantního rozdílu mezi dny 10 a 21. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi ovlivněnými buňkami 4., 10. a 21. den experimentu (Obrázek 15C). ETSC se mezi 4. a 10. dnem nelišilo a poté mělo tendenci klesat, což vedlo k významnému rozdílu mezi kontrolou DMSO a 1 μM DDE u adipocytů v 21. den experimentu. ETSC kontrolních DMSO buněk byl statisticky významně nižší ve 21. den ve srovnání s 10. dnem (Obrázek 15D) [Kladnicka et al. 2021].

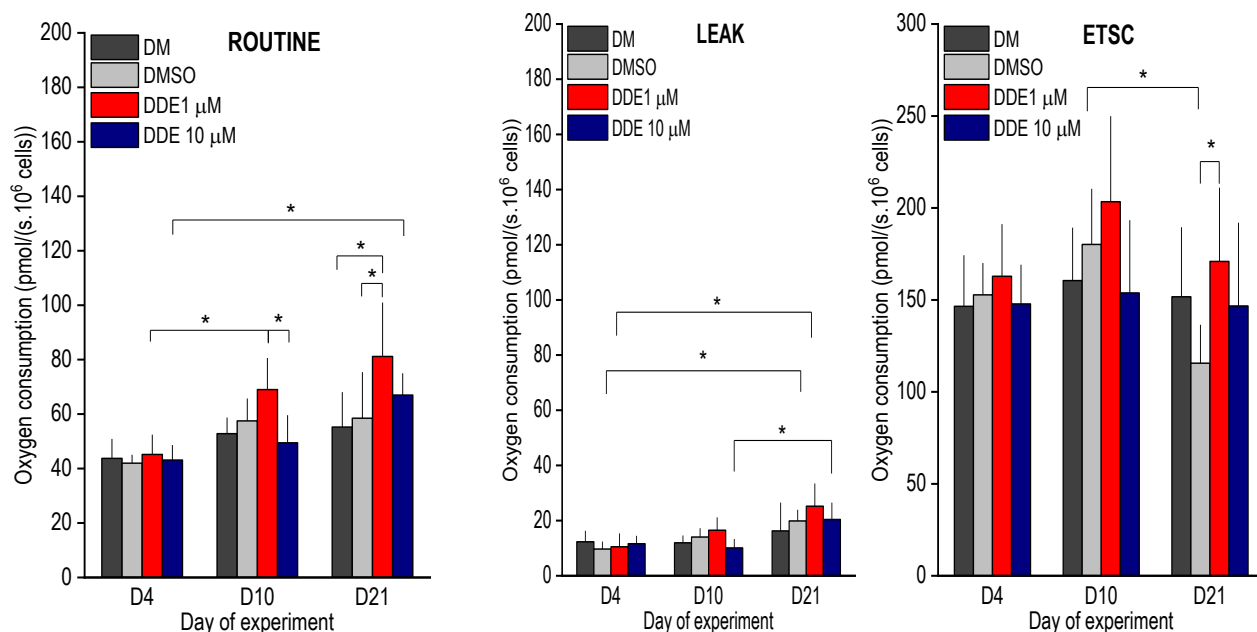


C**D**

Obrázek 15 - Mitochondriální respirometrie adipocytů pomocí oxygrafu-2K (OROBOROS)

Legenda: A-D: A. Typický záznam spotřeby kyslíku buňkami a použitý protokol. B. – D. Mitochondriální spotřeba kyslíku nediferencovanými kmenovými buňkami (den 0) a intaktními zrajícími adipocyty v průběhu diferenciaci (den 4 a 21) ve stavech ROUTINE, LEAK a ETS.

D = den; ROUTINE (ROUT) = rutinní respirace; LEAK = oligomycinem navozený stav LEAK nutný k udržení mitochondriálního membránového potenciálu; ETS = rozpřahovačem stimulovaná respirace, reflektuje maximální kapacitu elektron-transportního systému; ROX = stav reziduální spotřeby kyslíku po inhibici komplexu III antimycinem A.



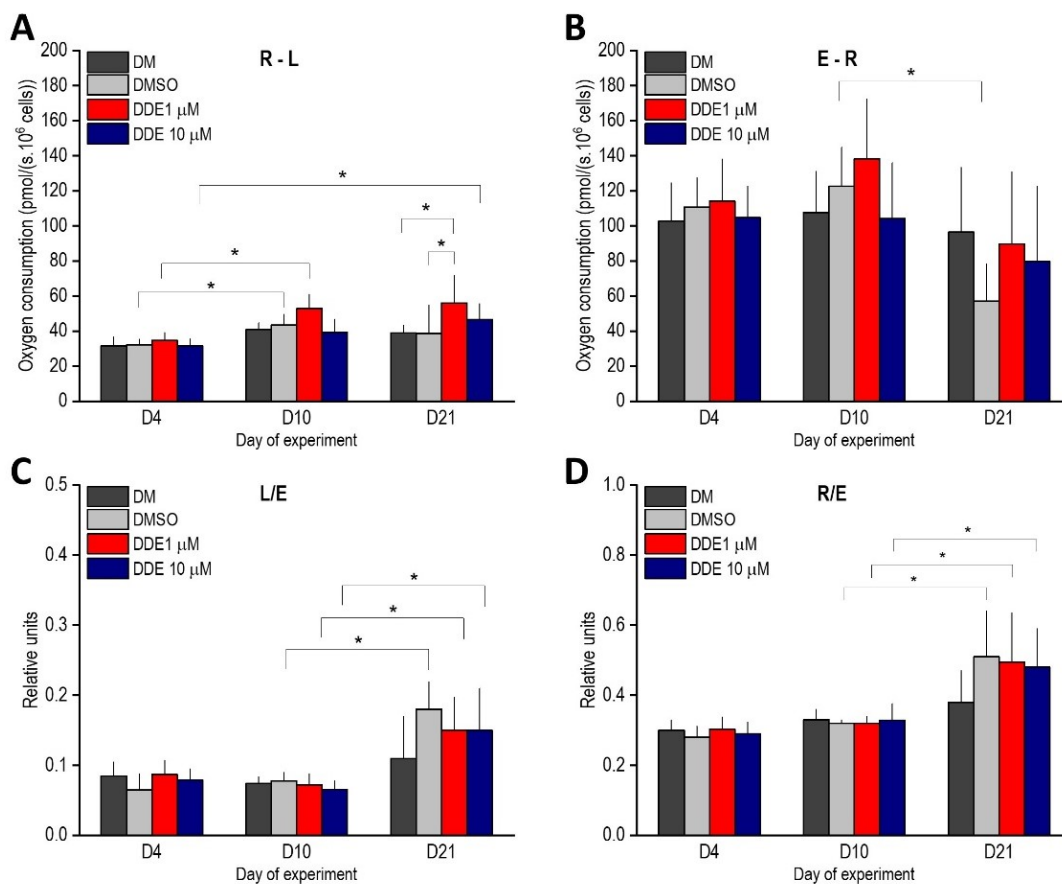
Obrázek 15 - Neovlivněná a ovlivněná spotřeba kyslíku během adipogeneze

[Kladnicka et al. 2021]

Legenda: (A-C) ROUTINE, LEAK a odpražená (ETSC) spotřeba kyslíku adipocyty diferencující se v médiu neobsahující žádné aditivum (DM) nebo DMSO, DMSO a 1 μM p,p'-DDE a DMSO a 10 μM p,p'-DDE ve dnech 4, 10 a 21 experimentu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za významné (Dvojestná ANOVA a následně post-hoc Tukeyho test).

Spotřeba kyslíku spojená s tvorbou ATP, tj. stav R-L, se mezi dny 4 a 10 mírně zvýšila ve všech skupinách diferencujících adipocytů a poté zůstal tento stav stabilní. Významný rozdíl nastal mezi dnem 4 a 10 pouze u 1 μM DDE a DMSO. V 21 den experimentu byla R-L významně vyšší u 1 μM DDE ve srovnání s kontrolními skupinami DM a DMSO. Rezervní respirační kapacita, tj. stav ER poklesl mezi 10. a 21. dnem, ale tento pokles byl významný pouze u adipocytů v DMSO. Poměr spřažení L/E se statisticky významně zvýšil ve všech vzorcích obsahujících DMSO v 21. den, což naznačuje, že rozsah rozpražení byl podobný u DM a adipocytů ošetřených DDE. Poměr spřažení L/E se statisticky významně zvýšil ve všech vzorcích obsahujících DMSO v den 21. Z toho lze usuzovat, že míra rozpražení byla u kontrol a DDE obsahujících vzorků podobná. Poměr R/E vzrostl ve srovnatelné míře ve všech skupinách adipocytů 21. den pokusu. To dokládá,

že v pozdějších fázích diferenciace se rutinní dýchání nachází blíže ETSC (obrázek 16) [Kladnicka et al. 2021].



Obrázek 16 - Neovlivněná a ovlivněná spotřeba kyslíku spojená s tvorbou ATP během adipogeneze [Kladnicka et al. 2021]

Legenda: (A, B) Spotřeba kyslíku spojená s tvorbou ATP (R-L) a rezervní kapacita ETS (E-R) v adipocytech diferencujících v médiu neobsahujícím žádné aditivum (DM) nebo DMSO, DMSO a 1 μM p,p'-DDE a DMSO a 10 μM p,p'-DDE ve dnech 4, 10 a 21 experimentu. (C, D) poměry řízení toku L/E a R/E. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za významné (Friedman a Wilcoxon test).

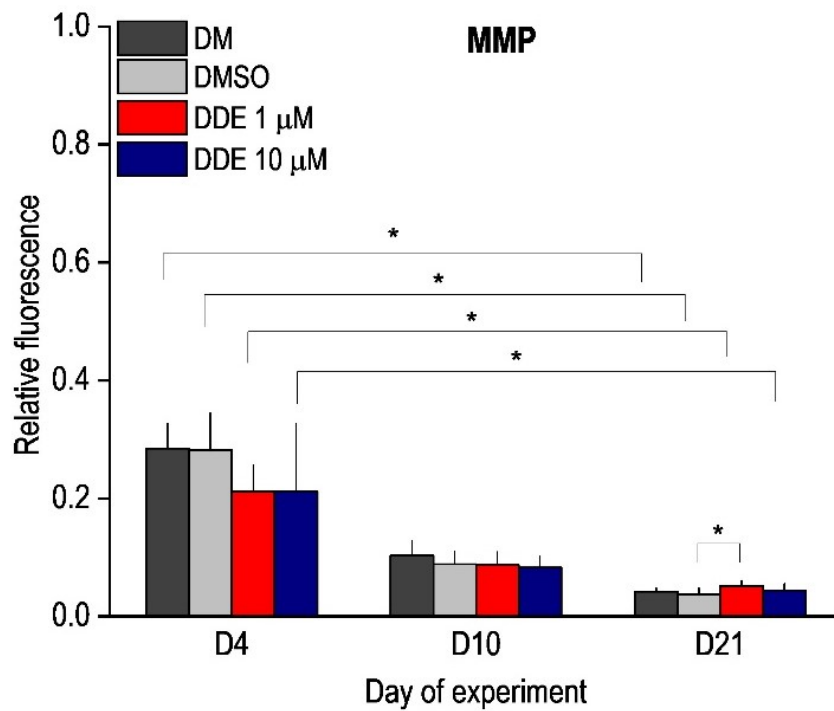
3. Aktivita citrátsyntázy

Aktivita citrátsyntázy se pohybovala mezi $10,61 \pm 5,26$ a $18,32 \pm 4,74$ mIU/ 10^6 buněk v DMSO v 21. den a u 1 μM p,p'-DDE v 10. den. Nepozorovali jsme signifikantní rozdíly

mezi jednotlivými skupinami při žádném z měření v průběhu experimentu ani mezi adipocyty v rámci stejné intervence.

4. Mitochondriální membránový potenciál (MMP)

MMP je jedním z klíčových parametrů mitochondriální funkce a slouží jako indikátor buněčného zdraví – regulace syntézy ATP, produkce ROS, sekvestrace vápníku atd. U zdravých buněk se barvivo JC-1 dostává do mitochondrií a vytváří červené agregáty. Mitochondrie u buněk s nízkým mitochondriálním potenciálem netvoří agregáty a zůstávají ve formě monomeru se zelenou fluorescencí. Porovnali jsme barvení JC1 u neovlivněných diferencujících se adipocytů s ovlivněnými diferencujícími se adipocyty pod vlivem DMSO, DMSO a 1 μM p,p'-DDE a DMSO a 10 μM p,p'-DDE. Celkově jsme pozorovali postupný pokles poměru červená/zelená, který odpovídá našim předchozím zjištěním [Kladnická et al. 2019]. Čtvrtý den diferenciacie jsme pozorovali významný pokles MMP u 1 μM p,p'-DDE a 10 μM p,p'-DDE ve srovnání s médiem obsahujícím samotné DMSO. V 21. den diferenciacie bylo zvýšení poměru červená/zelená ve srovnání s médiem obsahujícím samotné DMSO (obrázek 17).



Obrázek 17 - Mitochondriální membránový potenciál (MMP) během adipocytární diferenciace [Kladnicka et al. 2021]

Legenda: Mitochondriální membránový potenciál (MMP) během adipocytární diferenciace v médiu neobsahujícím žádné aditiva (DM) nebo DMSO, DMSO a 1 μM p,p'-DDE a DMSO a 10 μM p,p'-DDE ve dnech 4, 10 a 21 experimentu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za významné (Friedman a Wilcoxon test). Čtvrtý den diferenciace byl sledován významný pokles MMP v buňkách ovlivněných DDE v koncentracích 1 a 10 M ve srovnání s médiem obsahujícím samotné DMSO. V buňkách postižených 1 M DDE došlo k významnému zvýšení MMP 21. den diferenciace ve srovnání s kontrolními buňkami vystavenými samotnému DMSO

6 Diskuze

V naší studii jsme sledovali dopad chronické expozice DDE ve dvou různých koncentracích na vyvíjející se adipocyty pocházející z hADMSC's. Je dobře známo, že kmenové buňky jsou vysoce glykolytické buňky a mají mechanismy, které aktivně potlačují mitochondriální dýchání [Khacho a Slack 2017]. Kmenové buňky jsou pravděpodobně méně závislé na funkčních mitochondriích, pokud jde o energii nebo metabolické potřeby, ale po zahájení a během diferenciaci je nezbytný metabolický přechod směrem k oxidativní fosforylaci, aby se získal dostatek energie. Zdá se, že mitochondriální biogeneze a zvýšená mitochondriální respirace jsou pravděpodobně obecným znakem diferenciaci dospělých kmenových buněk [Hofmann et al. 2012].

Adipogenní diferenciaci hADMSC's byla provedena pomocí komerčního kultivačního média. Po čtyřech dnech bylo již možné pozorovat první lipidové kapénky a s postupem diferenciaci se počet a velikost lipidových kapének zvýšila nejrychleji mezi 10. a 21. dnem adipogeneze. Tento trend byl dokumentován pomocí barvení Oil Red O. V 21. den adipogeneze jsme vyhodnotili množství tuku, bez statistického významu u ovlivněných buněk.

Test životaschopnosti kvantifikující redukci nefluorescenčního resazurinu na fluorescenční resofurin mitochondriálními a cytoplazmatickými enzymy ukázal, že během neovlivněné diferenciaci adipocytů nedošlo k žádné tendenci ke zhoršenému buněčnému metabolismu [Zalata et al. 1998]. U ovlivněných buněk došlo k statistické významnosti ve dnech 10 a 21 mezi DDE 10 μM a DDE 1 μM , kdy buňky vystavené nižší koncentraci polutantu vykazovaly vyšší životaschopnost.

Zjistili jsme, že dlouhotrvající vliv DDE v koncentraci 1 μM na rozdíl od buněk vystavených koncentraci 10 μM vede ke statisticky významným odchylkám v mitochondriální respiraci oproti kontrolám. Charakteristický vzorec změn v mitochondriální respiraci během adipogeneze nebyl při nižší koncentraci DDE použité v pokusu narušen a vykazoval typický postupný vzrůst rutinní a LEAK respirace dozrávajících adipocytů [Kladnická et al. 2019]. V 21. den experimentu, tj. u již zralých adipocytů, jsme nicméně zaznamenali vyšší mitochondriální membránový potenciál, vyšší

klidovou spotřebu kyslíku (rutinní respiraci) a vyšší respiraci spojenou s tvorbou ATP (R-L) u vzorků s DDE 1 μM ve srovnání s kontrolami. Podle našich výsledků by nižší koncentrace polutantu během chronické expozice mohla významněji modulovat fyziologické procesy, v tomto případě patrně prostřednictvím endokrinní disrupce. Takové zjištění může být překvapivé, protože většina studií zabývajících se dopadem organofosfátů na mitochondriální funkce popisovala narušení spotřeby kyslíku ve studovaných tkáních [La Merrill a Birnbaum 2011; Elmore a La Merrill 2019; Khanna et al. 2010; Furuhashi et al. 2014; Zhang et al. 2013; Byczkowski 1976]. Je třeba poznamenat, že koncentrace DDT a DDE použité v těchto studiích byly relativně vysoké a jejich účinky byly hodnoceny primárně v mitochondriích jater a svalu po jednorázové expozici. Design našeho experimentu se odlišuje chronicitou expozicí, nižšími koncentracemi použitého polutantu, souvislým působením DDE na celý proces diferenciací až do stádia maturace a typem studovaných buněk.

Přiměřená funkce mitochondrií obecně a při oxidativní fosforylaci zvláště je klíčová pro tvorbu ATP a energetickou homeostázu celého těla. Možná role mitochondriální dysfunkce byla popsána v rozvoji mnohých patologických stavů spojených s obezitou, tj. výsledkem nerovnováhy mezi příjmem potravy a výdejem energie, např. diabetes mellitus II. typu. Mitochondriální dysfunkce však nutně neznamená, že mitochondriální spotřeba kyslíku a produkce ATP by měla být snížena ve všech tkáních zapojených do regulace energetické homeostázy. Tkáňově specifické řízení mitochondriální respirace bylo demonstrováno u obézních diabetických myší, které vykazovaly narušenou mitochondriální respiraci v játrech a oxidativním kosterním svalu, ale zvýšenou spotřebu kyslíku v glykolytickém kosterním svalu [Holmström et al. 2012]. Jiná studie popsala zvýšenou mitochondriální spotřebu kyslíku v hnědé tukové tkáni u obézních myší [Alcalá et al. 2017].

Pokles oxidativní fosforylace u adipocytů navíc ovlivnil energetickou homeostázu a chránil před rozvojem obezity a inzulinové rezistence u myší krmených dietou s vysokým obsahem tuku [Choi a Diehl 2008]. Ve studii vedené Böhmem (2020) byla zvýšená mitochondriální respirace adipocytů izolovaných od obézních dárců s inzulinovou rezistencí připsána adaptací buněčného metabolismu na zvýšené množství živin spojené s inzulinovou rezistencí [Böhm et al. 2020].

V naší studii byl přísun metabolických substrátů stejný ve všech experimentálních skupinách. Zvýšená potřeba ATP u adipocytů vystavených DDE by mohla být spojena s podpůrným účinkem DDE a podobných polutantů na *de novo* syntézu tuků a jejich akumulaci [Kim et al. 2016]. Byly také doloženy negativní účinky DDT/DDE na expresi termogenních proteinů a substrátový transport a utilizaci v adipocytech, což by mohlo vést ke zvýšené potřebě ATP ke kompenzaci narušeného transportu živin nebo ztrát tepla [Gregoire et al. 1998].

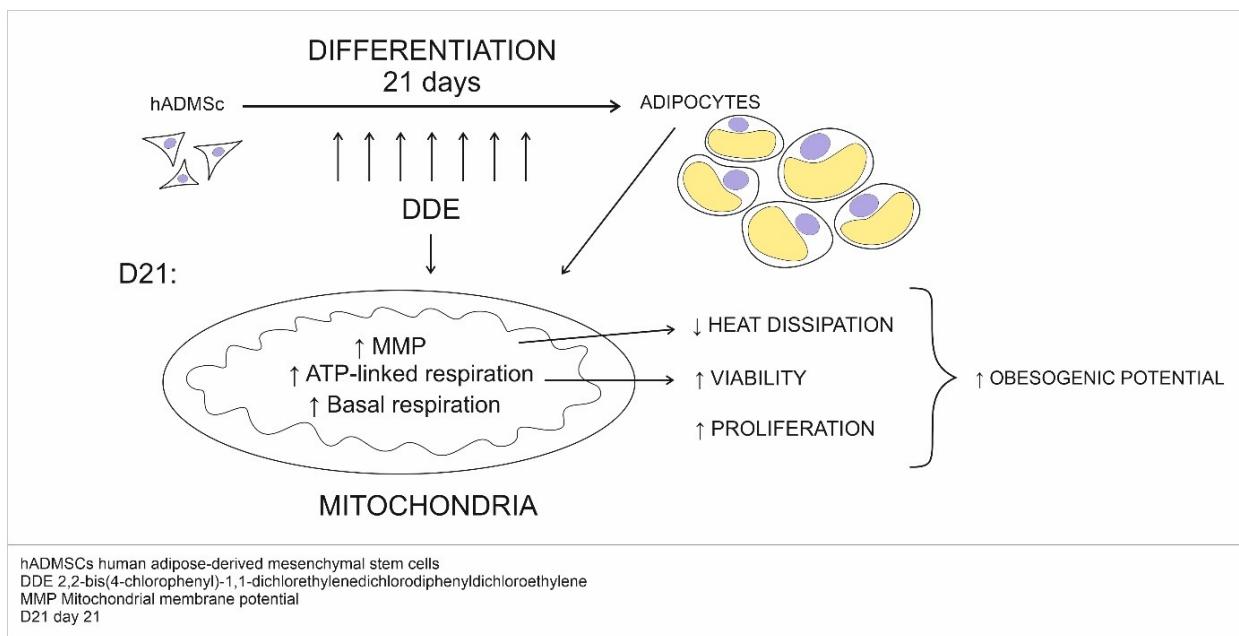
Podle nedávné studie by narušení termogeneze u adipocytů vystavených DDT mohlo být způsobeno cílením na mechanismy mimo tukovou tkáň bez nutnosti ovlivnění exprese uncouplig proteinů [vonderEmbse et al. 2021]. V naší studii musela LEAK respirace kompenzovat únik protonů, elektronů a cyklování kationtů, které rostly v průběhu diferenciaci adipocytu ve všech skupinách ve stejné míře, bez signifikantního rozdílu mezi skupinami vystavenými DDE a kontrolami v 21. den. Zvýšená E-R kapacita (respirační rezerva) byla jediným parametrem ovlivněným dlouhodobou expozicí DMSO (mezi dny 10 a 21 diferenciaci). Stejný trend byl však pozorován u DDE adipocytů ve 21. den, což ověřilo naše předchozí zjištění, že v pozdějších stádiích diferenciaci mohla být rutinní respirace zvýšena pouze na úkor celkové kapacity elektronového transportu v mitochondriích [Kladnická et al. 2019]. Poměr rutinní a maximální respirace (R/E) byl v 21. den pokusu téměř totožný u DMSO kontrol a adipocytů vystavených DDE a u všech jmenovaných skupin dosahoval signifikantně vyšších hodnot než v 10. den diferenciaci.

Dalším zajímavým zjištěním naší studie je fakt, že při vyšší koncentraci 10 μ M DDE nebyl pozorován žádný účinek a mezi těmito buňkami a kontrolními adipocyty nebyly pozorovány signifikantní změny. Buňky exponované 10 μ M DDE však vykazovaly pozdější nástup změn mitochondriálních parametrů spojených s normální adipogenezí, tj. vzestup rutinní respirace a spotřeby kyslíku spojené s tvorbou ATP. Takové „,obousměrné“ rysy buněčných funkcí byly pozorovány u rozličných polutantů, nejsou novým zjištěním a činí výzkum možných dopadů endokrinních disruptorů komplikovanějším [Nevoral et al. 2018].

Dopad DDE na mitochondriální funkce u lidských diferencujících se adipocytů se v naší studii projevil ve dvou různých ohledech: (i) při vyšší koncentraci DDE použité v experimentu došlo ke zpomalení diferenciačního procesu, (ii) při nižší koncentraci DDE

byla pozorována zvýšená mitochondriální respirace a tvorba ATP s potenciálem zapříčinit narušení energetické homeostázy.

Mitochondriální dysfunkce adipocytu potom může být zapojena do patogeneze metabolických chorob spojených s obezitou jako je diabetes mellitus II., zvláště v případě trvale zvýšené dodávky metabolických substrátů. Zvýšená expozice buněk saturovaným mastným kyselinám, která je rovněž spojena s vyšším vystavením DDT a DDE z potravy živočišného původu, by mohla zvyšovat mitochondriální dysfunkci dalších tkání a narušovat energetickou rovnováhu celého organismu [Hirabara et al. 2010].



Obrázek 18 - Vizualizace průběhu pokusu a předpokládaný vliv zjištěných poznatků

7 Závěr

Obezita je v posledních 40 letech celosvětovou pandemií. Jedná se o chronické relapsující onemocnění, které je charakterizované zmnoženou nebo histologicky i funkčně změněnou tukovou tkání. Toto onemocnění je vstupní branou k dalším neinfekčním chronickým onemocněním. Není pochyb o tom, že s nástupem masivního vzestupu celosvětové prevalence obezity během velmi krátké doby v existenci lidstva, souvisí razantní změna životního stylu lidí. Kromě vlivu snížené fyzické aktivity, zhoršené nutriční kvality ve výživě, sociální izolace a dalších faktorů, se stále více znalostí v etiologii obezity týká i tzv. obezogenů, tedy cizorodých látek, antropogenní činností znečišťujících životní prostředí, kterým je pak lidský organismus sám exponován, především formou příjmu potravinami. Ukazuje se, že tyto obezogeny se nejrůznějšími mechanismy podílejí na rozvoji obezity a dysfunkci tukové tkáně. Naším cílem bylo přispět k poznání účinku chronické expozice jednoho v největším množství se v tukové tkáni člověka hromadícího polutantu – metabolitu DDT, p, p'-DDE.

Konkrétně v naší studii jsme sledovali chronický vliv 21 denního působení p, p'-DDE na lidské mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně zapojené do adipogeneze. Ve dnech 0, 4, 10 a 21 byla měřena mitochondriální spotřeba kyslíku a mitochondriální membránový potenciál (MMP), kdy byla hodnocena kvalita mitochondriální sítě a akumulace lipidů ve zralých buňkách. V porovnání s kontrolou (neovlivněné mezenchymální buňky diferencující do zralého adipocytu), buňky ovlivněné 1 μM p,p'-DDE významně zvýšili bazální (rutinní) mitochondriální dýchání, spotřebu kyslíku vázanou na ATP (adenosintrifosfát) a MMP intaktních buněk v 21. den adipogeneze. Oproti vyšší koncentraci polutantu 10 μM p,p'-DDE, kde došlo ke zpomalení zvýšené spotřeby kyslíku vázaného na ATP, která je typická pro normální adipogenezi. Organochlorovaný pesticid p,p'-DDE nezměnil aktivitu citrátsyntázy.

Souhrn: V koncentracích, 1 a 10 μM , odpovídajících rozsahu lidské expozice, jsme v modelu diferencujícího se adipocytu z lidské mezenchymální kmenové buňky, sledovali účinky chronické expozice p,p'-DDE jak na průběh diferenciaci, tak na markery maturovaného adipocytu.

Prokázali jsme odlišné ovlivnění adipocytární diferenciace v závislosti na chronické dávce polutantu, kdy při nižších koncentracích došlo u maturovaného adipocytu k zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu, k zvýšení bazální a s ATP vázané mitochondriální respirace, což ve svém výsledném účinku vykazuje obezogenní potenciál sníženou produkcí tepla, zvýšenou schopností proliferace a viability adipocytu. Chronická expozice vyšší koncentrací polutantu během diferenciace adipocytu naopak diferenciační proces zpomalovala. Tyto experimenty prokázaly schopnost chronické expozice v průběhu adipocytární diferenciace zasahovat do fyziologického procesu adipogeneze, a to v závislosti na dávce polutantu.

8 Přehled publikační činnosti autora

Zloch, Z.; Kladnická, I. Nové pohledy na význam rostlinných polyfenolů ve výživě. *VaP* 2018, 2018, 127–131.

Kladnická, I.; Čedíková, M.; Kripnerová, M.; Dvořáková, J.; Kohoutová, M.; Tůma, Z.; Müllerová, D.; Kuncová, J. Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue. *Physiological Research* 2019, S287–S296, doi:10.33549/physiolres.934353.

[IF 2019: 2,139]

Kladnicka, I.; Cedikova, M.; Jedlicka, J.; Kohoutova, M.; Muller, L.; Plavinova, I.; Kripnerova, M.; Bludovska, M.; Kuncova, J.; Mullerova, D. Chronic DDE Exposure Modifies Mitochondrial Respiration during Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Adipocytes. *Biomolecules* 2021, 11, 1068, doi:10.3390/biom11081068.

[IF 2021: 6,064]

Kladnicka, I.; Bludovska, M.; Plavinova, I.; Muller, L.; Mullerova, D. Obesogens in Foods. *Biomolecules* 2022, 12, 680, doi:10.3390/biom12050680.

[IF 2022: 6,064]

9 Literatura

1. ACHOUR, Amani, Abdelkader DEROUICHE, Badreddine BARHOUMI, Badreddine KORT, Driss CHERIF, Sondes BOUABDALLAH, Mohsen SAKLY, Khémais Ben RHOUMA, Soufiane TOUIL, Mohamed Ridha DRISS a Olfa TEBOURBI, 2017. 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]. **156**, 635–643 [vid. 2023-04-21]. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2017.04.021
2. ALCALÁ, Martín, María CALDERON-DOMINGUEZ, Eduviges BUSTOS, Pilar RAMOS, Núria CASALS, Dolors SERRA, Marta VIANA a Laura HERRERO, 2017. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [vid. 2021-06-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-16463-6
3. ANGRISH, Michelle M., Charlene A. MCQUEEN, Elaine COHEN-HUBAL, Maribel BRUNO, Yue GE a Brian N. CHORLEY, 2017. Editor's Highlight: Mechanistic Toxicity Tests Based on an Adverse Outcome Pathway Network for Hepatic Steatosis. *Toxicological Sciences* [online]. **159**(1), 159–169 [vid. 2020-10-19]. ISSN 1096-6080, 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfx121
4. BERRY, Ryan, Elise JEFFERY a Matthew S. RODEHEFFER, 2014. Weighing in on Adipocyte Precursors. *Cell Metabolism* [online]. **19**(1), 8–20 [vid. 2019-03-19]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2013.10.003
5. BETHEA, Cynthia L., Kevin MUELLER, Arubala P. REDDY, Steven G. KOHAMA a Henryk F. URBANSKI, 2017. Effects of obesogenic diet and estradiol on dorsal raphe gene expression in old female macaques. *PLOS ONE* [online]. **12**(6), e0178788 [vid. 2022-02-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0178788
6. BÖHM, Anja, Michaela KEUPER, Tobias MEILE, Marty ZDICHAVSKY, Andreas FRITSCHKE, Hans-Ulrich HÄRING, Martin Hrabě DE ANGELIS, Harald STAIGER a Andras FRANKO, 2020. Increased mitochondrial respiration of adipocytes from metabolically unhealthy obese compared to healthy obese individuals. *Scientific Reports* [online]. **10**(1) [vid. 2021-05-13]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-69016-9
7. BRAUN, Joseph M., Chris GENNINGS, Russ HAUSER a Thomas F. WEBSTER, 2016. What Can Epidemiological Studies Tell Us about the Impact of Chemical Mixtures on Human Health? *Environmental Health Perspectives* [online]. **124**(1) [vid. 2020-06-24]. ISSN 0091-6765, 1552-9924. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1510569
8. BYCZKOWSKI, Janusz Z., 1976. The mode of action of p,p'-DDT on mammalian mitochondria. *Toxicology* [online]. **6**(3), 309–314 [vid. 2021-06-21]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/0300-483X(76)90034-2
9. CEDIKOVA, Miroslava, Michaela KRIPNEROVÁ, Jana DVORAKOVA, Pavel PITULE, Martina GRUNDMANOVA, Vaclav BABUSKA, Dana MULLEROVA a Jitka KUNCOVA, 2016. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International* [online].

- 2016**, 1–11 [vid. 2019-02-26]. ISSN 1687-966X, 1687-9678. Dostupné z: doi:10.1155/2016/6067349
10. CIPOLLETTA, Daniela, Markus FEUERER, Amy LI, Nozomu KAMEI, Jongsoon LEE, Steven E. SHOELSON, Christophe BENOIST a Diane MATHIS, 2012. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* [online]. **486**(7404), 549–553 [vid. 2020-10-19]. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11132
 11. DE COSTER, Sam a Nicolas VAN LAREBEKE, 2012. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *Journal of Environmental and Public Health* [online]. **2012**, 1–52 [vid. 2022-03-31]. ISSN 1687-9805, 1687-9813. Dostupné z: doi:10.1155/2012/713696
 12. D'EON, Jessica C. a Scott A. MABURY, 2007. Production of Perfluorinated Carboxylic Acids (PFCAs) from the Biotransformation of Polyfluoroalkyl Phosphate Surfactants (PAPS): Exploring Routes of Human Contamination. *Environmental Science & Technology* [online]. **41**(13), 4799–4805 [vid. 2020-10-20]. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es070126x
 13. DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE, 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. **30**(4), 293–342 [vid. 2022-03-31]. ISSN 0163-769X, 1945-7189. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002
 14. ELLIS, David A., Jonathan W. MARTIN, Amila O. DE SILVA, Scott A. MABURY, Michael D. HURLEY, Mads P. SULBAEK ANDERSEN a Timothy J. WALLINGTON, 2004. Degradation of Fluorotelomer Alcohols: A Likely Atmospheric Source of Perfluorinated Carboxylic Acids. *Environmental Science & Technology* [online]. **38**(12), 3316–3321 [vid. 2020-10-20]. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es049860w
 15. ELMORE, Sarah E. a Michele A. LA MERRILL, 2019. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **10** [vid. 2021-09-03]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2019.00122
 16. ERIKSSON, Dennis, Klaus AMMANN, Bruce CHASSY a Aakash CHAWADE, 2018. Comments on two recent publications on GM maize and Roundup. *Scientific Reports* [online]. **8**(1) [vid. 2020-10-19]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30440-7
 17. FLEGAL, Katherine M., Orestis A. PANAGIOTOU a Barry I. GRAUBARD, 2015. Estimating population attributable fractions to quantify the health burden of obesity. *Annals of Epidemiology* [online]. **25**(3), 201–207. ISSN 1873-2585. Dostupné z: doi:10.1016/j.annepidem.2014.11.010
 18. FOULDS, Charles E., Lindsey S. TREVIÑO, Brian YORK a Cheryl L. WALKER, 2017. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. **13**(8), 445–457 [vid. 2020-10-19]. ISSN 1759-5029, 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2017.42
 19. FUJII, Yukiko, Kouji H. HARADA a Akio KOIZUMI, 2013. Occurrence of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) in personal care products and compounding agents.

- Chemosphere* [online]. **93**(3), 538–544 [vid. 2020-10-20]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.049
20. FURUHASHI, Masato, Shigeyuki SAITOH, Kazuaki SHIMAMOTO a Tetsuji MIURA, 2014. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* [online]. **8s3**, CMC.S17067 [vid. 2021-06-25]. ISSN 1179-5468, 1179-5468. Dostupné z: doi:10.4137/CMC.S17067
 21. GREGOIRE, Francine M., Cynthia M. SMAS a Hei Sook SUL, 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* [online]. **78**(3), 783–809 [vid. 2019-03-05]. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783
 22. GRÜN, Felix a Bruce BLUMBERG, 2006. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology* [online]. **147**(6), s50–s55 [vid. 2020-05-13]. ISSN 0013-7227, 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2005-1129
 23. GRÜN, Felix a Bruce BLUMBERG, 2009. Minireview: The Case for Obesogens. *Molecular Endocrinology* [online]. **23**(8), 1127–1134 [vid. 2020-06-23]. ISSN 0888-8809, 1944-9917. Dostupné z: doi:10.1210/me.2008-0485
 24. HEINDEL, Jerrold J. a Bruce BLUMBERG, 2019. Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. **59**(1), 89–106 [vid. 2020-05-14]. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021304
 25. HEINDEL, Jerrold J., Retha NEWBOLD a Thaddeus T. SCHUG, 2015. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. **11**(11), 653–661 [vid. 2020-05-13]. ISSN 1759-5029, 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2015.163
 26. HIRABARA, Sandro M., Rui CURI a Pierre MAEHLER, 2010. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **222**(1), 187–194 [vid. 2021-06-22]. ISSN 00219541, 10974652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.21936
 27. HOFMANN, Andreas D., Mandy BEYER, Udo KRAUSE-BUCHHOLZ, Manja WOBUS, Martin BORNHÄUSER a Gerhard RÖDEL, 2012. OXPHOS Supercomplexes as a Hallmark of the Mitochondrial Phenotype of Adipogenic Differentiated Human MSCs. *PLoS ONE* [online]. **7**(4), e35160 [vid. 2019-03-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035160
 28. HOLMSTRÖM, Maria H., Eduardo IGLESIAS-GUTIERREZ, Juleen R. ZIERATH a Pablo M. GARCIA-ROVES, 2012. Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* [online]. **302**(6), E731–E739 [vid. 2021-06-25]. ISSN 0193-1849, 1522-1555. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00159.2011
 29. CHEN, Jin-Qiang, Terry R. BROWN a Jose RUSSO, 2009. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochimica et Biophysica*

- Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1793**(7), 1128–1143 [vid. 2023-03-29]. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2009.03.009
30. CHOI, Steve S a Anna Mae DIEHL, 2008. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease: *Current Opinion in Lipidology* [online]. **19**(3), 295–300 [vid. 2020-06-23]. ISSN 0957-9672. Dostupné z: doi:10.1097/MOL.0b013e3282ff5e55
 31. JANESICK, Amanda S. a Bruce BLUMBERG, 2016. Obesogens: an emerging threat to public health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. **214**(5), 559–565 [vid. 2020-06-24]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2016.01.182
 32. JANESICK, Amanda S., Toshihiro SHIODA a Bruce BLUMBERG, 2014. Transgenerational inheritance of prenatal obesogen exposure. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **398**(1–2), 31–35 [vid. 2020-05-13]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2014.09.002
 33. JIMENEZ TORRES, M., C. CAMPOY FOLGOSO, F. CAÑABATE RECHE, A. RIVAS VELASCO, I. CERRILLO GARCIA, M. MARISCAL ARCAS a F. OLEA-SERRANO, 2006. Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. *Science of The Total Environment* [online]. **372**(1), 32–38 [vid. 2023-04-21]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.009
 34. KAPUSCINSKI, J., 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* [online]. **70**(5), 220–233. ISSN 1052-0295. Dostupné z: doi:10.3109/10520299509108199
 35. KAPUŚCIŃSKI, J. a W. SZER, 1979. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Research* [online]. **6**(11), 3519–3534. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/6.11.3519
 36. KHACHO, Mireille a Ruth S SLACK, 2017. Mitochondrial activity in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **49**, 1–8 [vid. 2019-03-19]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2017.11.003
 37. KHANNA, Shally, NarendraNath SINGH a Vr BRAVE, 2010. Natural dyes versus lysochrome dyes in cheiloscopy: A comparative evaluation. *Journal of Forensic Dental Sciences* [online]. **2**(1), 11 [vid. 2021-03-05]. ISSN 0974-2948. Dostupné z: doi:10.4103/0974-2948.71051
 38. KIM, Jonggun, Quancai SUN, Yiren YUE, Kyong Sup YOON, Kwang-Youn WHANG, J. MARSHALL CLARK a Yeonhwa PARK, 2016. 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. **131**, 40–45 [vid. 2021-05-11]. ISSN 00483575. Dostupné z: doi:10.1016/j.pestbp.2016.01.005
 39. KIMURA, Osamu, Yukiko FUJII, Koichi HARAGUCHI, Yoshihisa KATO, Chiho OHTA, Nobuyuki KOGA a Tetsuya ENDO, 2020. Effects of perfluoroalkyl carboxylic acids on the uptake of sulfobromophthalein via organic anion transporting polypeptides in human intestinal Caco-2 cells. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. **24**, 100807 [vid. 2020-10-20]. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2020.100807

40. Kladnická, I., M. Čedíková, M. Kripnerová, J. Dvořáková, M. Kohoutová, Z. Tůma, D. Müllerová a J. Kunčová, 2019. Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue. *Physiological Research* [online]. 5287–5296 [vid. 2021-03-05]. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934353
41. Kladnicka, Iva, Monika Bludovska, Iveta Plavinova, Ludek Muller a Dana Mullerova, 2022. Obesogens in Foods. *Biomolecules* [online]. **12**(5), 680 [vid. 2022-06-15]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom12050680
42. Kladnicka, Iva, Miroslava Cedikova, Jan Jedlicka, Michaela Kohoutova, Ludek Muller, Iveta Plavinova, Michaela Kripnerova, Monika Bludovska, Jitka Kunčova a Dana Mullerova, 2021. Chronic DDE Exposure Modifies Mitochondrial Respiration during Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Adipocytes. *Biomolecules* [online]. **11**(8), 1068 [vid. 2021-07-26]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom11081068
43. Knejzlik, Zdeněk, Jan Káš a Tomáš Ruml, [b.r.]. Mechanism of Xenobiotics Entry into the Organism and Their Detoxication. *Chemické listy* [online]. **2000**(94), 913–918. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2479>
44. Kuznetsov, Andrey V., Daniela Strobl, Elfriede Ruttmann, Alfred Königsrainer, Raimund Margreiter a Erich Gnaiger, 2002. Evaluation of Mitochondrial Respiratory Function in Small Biopsies of Liver. *Analytical Biochemistry* [online]. **305**(2), 186–194 [vid. 2019-03-19]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2002.5658
45. La Merrill, Michele a Linda S. Birnbaum, 2011. Childhood Obesity and Environmental Chemicals. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* [online]. **78**(1), 22–48 [vid. 2020-06-24]. ISSN 00272507. Dostupné z: doi:10.1002/msj.20229
46. Liu, Gang, Klodian Dhana, Jeremy D. Furtado, Jennifer Rood, Geng Zong, Liming Liang, Lu Qi, George A. Bray, Lilian DeJonge, Brent Coull, Philippe Grandjean a Qi Sun, 2018. Perfluoroalkyl substances and changes in body weight and resting metabolic rate in response to weight-loss diets: A prospective study. *PLOS Medicine* [online]. **15**(2), e1002502 [vid. 2020-06-24]. ISSN 1549-1676. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pmed.1002502
47. Lüllmann, Heinz, Klaus Mohr, Martin Wehling, Maxmilián Wenke a Elfrída Mühlbacherová, 2004. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0836-2.
48. Lyn, Rodney, Erica Heath a Janhavi Dubhashi, 2019. Global Implementation of Obesity Prevention Policies: a Review of Progress, Politics, and the Path Forward. *Current Obesity Reports* [online]. **8**(4), 504–516 [vid. 2023-01-05]. ISSN 2162-4968. Dostupné z: doi:10.1007/s13679-019-00358-w
49. Malarvannan, Govindan, Eveline Dirinck, Alin C. Dirtu, Anna Pereira-Fernandes, Hugo Neels, Philippe G. Jorens, Luc Van Gaal, Ronny Blust a Adrian Covaci, 2013. Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environment International* [online]. **55**, 33–42 [vid. 2023-04-21]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2013.02.012

50. MOHAJER, Nicole, Chrislyn Y. DU, Christian CHECKCINCO a Bruce BLUMBERG, 2021. Obesogens: How They Are Identified and Molecular Mechanisms Underlying Their Action. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **12**, 780888 [vid. 2022-03-31]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2021.780888
51. MÜLLEROVÁ, D a J KOPECKÝ, 2007. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological Research* [online]. 375–382 [vid. 2022-03-31]. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.931022
52. NEVORAL, Jan, Yaroslav KOLINKO, Jiří MORAVEC, Tereza ŽALMANOVÁ, Kristýna HOŠKOVÁ, Šárka PROKEŠOVÁ, Pavel KLEIN, Kamar GHAIBOUR, Petr HOŠEK, Miriama ŠTIAVNICKÁ, Hedvika ŘIMNÁČOVÁ, Zbyněk TONAR, Jaroslav PETR a Milena KRÁLÍČKOVÁ, 2018. Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction* [online]. **156**(1), 47–57 [vid. 2022-06-21]. ISSN 1470-1626, 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-18-0092
53. NEWBOLD, Retha R., Elizabeth PADILLA-BANKS a Wendy N. JEFFERSON, 2009. Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **304**(1–2), 84–89 [vid. 2020-06-24]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2009.02.024
54. OUCHI, Noriyuki, 2016. Adipocytokines in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* [online]. **23**(6), 645–654 [vid. 2020-05-13]. ISSN 1340-3478, 1880-3873. Dostupné z: doi:10.5551/jat.34918
55. PATOČKA, Jiří, 2003. *Úvod do obecné toxikologie*. 1. vyd. Praha: Manus. ISBN 978-80-86571-04-1.
56. PESTA, Dominik a Erich GNAIGER, 2012. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. In: Carlos M. PALMEIRA a António J. MORENO, ed. *Mitochondrial Bioenergetics* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, s. 25–58 [vid. 2019-03-19]. ISBN 978-1-61779-381-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-382-0_3
57. PETRAKIS, Demetrios, Loukia VASSILOPOULOU, Charalampos MAMOULAKIS, Christos PSYCHARAKIS, Alike ANIFANTAKI, Stavros SIFAKIS, Anca DOCEA, John TSIAOUSSIS, Antonios MAKRIGIANNAKIS a Aristides TSATSAKIS, 2017. Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **14**(10), 1282 [vid. 2020-10-19]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph14101282
58. PROKEŠ, Jaroslav, 2005. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén : Karolinum. ISBN 978-80-7262-301-3.
59. QIAO, Liping, Kayee CHU, Jean-Sebastien WATTEZ, Samuel LEE, Hongfei GAO, Gen-Sheng FENG, William W. HAY a Jianhua SHAO, 2019. High-fat feeding reprograms maternal energy metabolism and induces long-term postpartum obesity in mice. *International Journal of Obesity* [online]. [vid. 2019-03-19]. ISSN 0307-0565, 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/s41366-018-0304-x

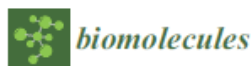
60. RUBIN, Donald B., 2001. Estimating the causal effects of smoking. *Statistics in Medicine* [online]. **20**(9–10), 1395–1414 [vid. 2020-10-19]. ISSN 0277-6715, 1097-0258. Dostupné z: doi:10.1002/sim.677
61. RUIZ-OJEDA, Francisco, Azahara RUPÉREZ, Carolina GOMEZ-LLORENTE, Angel GIL a Concepción AGUILERA, 2016. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(7), 1040 [vid. 2020-10-19]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17071040
62. SADIE-VAN GIJSEN, Hanél, 2019. Adipocyte biology: It is time to upgrade to a new model: SADIE-VAN GIJSEN. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **234**(3), 2399–2425 [vid. 2019-03-19]. ISSN 00219541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.27266
63. SHEPHERD, P. R., L. GNUDI, E. TOZZO, H. YANG, F. LEACH a B. B. KAHN, 1993. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**(30), 22243–22246. ISSN 0021-9258.
64. SPIEGELMAN, B. M. a J. S. FLIER, 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. **87**(3), 377–389. ISSN 0092-8674.
65. SWEDENBORG, Elin, Joëlle RÜEGG, Sari MÄKELÄ a Ingemar PONGRATZ, 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. **43**(1), 1–10 [vid. 2022-03-31]. ISSN 0952-5041, 1479-6813. Dostupné z: doi:10.1677/JME-08-0132
66. ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZEBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA, 2018. *Farmakologie*. B.m.: grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-5558-8.
67. TANG, Qi Qun a M. Daniel LANE, 2012. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **81**(1), 715–736 [vid. 2019-03-19]. ISSN 0066-4154, 1545-4509. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718
68. VONDEREMBSE, Annalise N., Sarah E. ELMORE, Kyle B. JACKSON, Beth A. HABECKER, Katherine E. MANZ, Kurt D. PENNELL, Pamela J. LEIN a Michele A. LA MERRILL, 2021. Developmental exposure to DDT or DDE alters sympathetic innervation of brown adipose in adult female mice. *Environmental Health* [online]. **20**(1) [vid. 2021-05-13]. ISSN 1476-069X. Dostupné z: doi:10.1186/s12940-021-00721-2
69. WATKINS, O., 1948. Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. **56**(5), 821–834 [vid. 2022-02-09]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/0002-9378(48)90440-2
70. WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE a PROQUEST (FIRM), 2019. *EUROPEAN HEALTH REPORT 2018: more than numbers, evidence for all*. [online]. S.l.: WHO REGIONAL OFFICE FOR E [vid. 2020-06-26]. ISBN 978-92-4-069876-5. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/qut/detail.action?docID=5916237>

71. ZALATA, A. A., N. LAMMERTIJN, A. CHRISTOPHE a F. H. COMHAIRE, 1998. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *International Journal of Andrology*. **21**(5), 289–294. ISSN 0105-6263.
72. ZHANG, Yanmin, Glenn MARSBOOM, Peter T. TOTH a Jalees REHMAN, 2013. Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* [online]. **8**(10), e77077 [vid. 2019-03-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0077077
73. ZLOCH, Zdeněk a Iva KLADNICKÁ, 2018. Nové pohledy na význam rostlinných polyfenolů ve výživě. *Výživa a potraviny*. **2018**(5), 127–131.

10 Příloha

Obesogens in Foods

Iva Kladnicka ^{1,2,*}, Monika Bludovska ^{1,3}, Iveta Plavinova ¹, Ludek Muller ² and Dana Mullerova ^{1,2}



Review

Obesogens in Foods

Iva Kladnicka ^{1,2,*}, Monika Bludovska ^{1,3}, Iveta Plavinova ¹, Ludek Muller ² and Dana Mullerova ^{1,2}

¹ Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic; monika.bludovska@lfp.cuni.cz (M.B.); iveta.plavinova@lfp.cuni.cz (I.P.); dana.mullerova@lfp.cuni.cz (D.M.)

² Department of Cybernetics, European Centre of Excellence New Technologies for the Information Society, University of West Bohemia, 301 00 Pilsen, Czech Republic; muller@kkj.zcu.cz

³ Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic

* Correspondence: iva.kladnicka@lfp.cuni.cz; Tel: +420-377-593-193

Abstract: Obesogens, as environmental endocrine-disrupting chemicals, are supposed to have had an impact on the prevalence of rising obesity around the world over the last forty years. These chemicals are probably able to contribute not only to the development of obesity and metabolic disturbances in individuals, but also in their progeny, having the capability to epigenetically reprogram genetically inherited set-up points for body weight and body composition control during critical periods of development, such as fetal, early life, and puberty. In individuals, they may act on myriads of neuro-endocrine-immune metabolic regulatory pathways, leading to pathophysiological consequences in adipogenesis, lipogenesis, lipolysis, immunity, the influencing of central appetite and energy expenditure regulations, changes in gut microbiota-intestine functioning, and many other processes. Evidence-based medical data have recently brought much more convincing data about associations of particular chemicals and the probability of the raised risk of developing obesity. Foods are the main source of obesogens. Some obesogens occur naturally in food, but most are environmental chemicals, entering food as a foreign substance, whether in the form of contaminants or additives, and they are used in a large amount in highly processed food. This review article contributes to a better overview of obesogens, their occurrence in foods, and their impact on the human organism.

Keywords: obesity; obesogens; food; adipose tissue; metabolic disruptors; systematic low-grade inflammation; metabolic syndrome



Citation: Kladnicka, I.; Bludovska, M.; Plavinova, I.; Muller, L.; Mullerova, D. Obesogens in Foods. *Biomolecules* **2022**, *12*, 680. <https://doi.org/10.3390/biom12050680>

Academic Editor: Chiara Macchi

Received: 12 April 2022

Accepted: 6 May 2022

Published: 9 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The rapid and significant increase in the prevalence of obesity worldwide over the last forty years is considered not to be attributed solely to genetic or life style risk factors, such as energy-dense and nutritionally poor diets, sedentary lifestyle, or aging. New evidence has shown that epigenetic, central regulatory pathways, and endocrine-disrupting changes that are associated with human exposure to man-made chemicals might also contribute to the obesity epidemic. So-called obesogens are xenobiotics directly or indirectly promoting adipogenesis and obesity in animals and humans, influencing individuals or their progeny. Many of these chemicals may also crossroad or modulate the effect of endogenous ligands of nuclear or non-nuclear transcription factors, participating in differentiation, metabolism, and the secretory function of adipocytes [1].

There are a number of examples in medicine that synthetically produced chemicals (drugs) may influence the development of adiposity. This usually adverse effect of pharmaceuticals is evidenced in glucocorticoids, estrogens, some antidiabetics (such as insulin, sulphonylureas, thiazolidinediones, glitazones), thyreostatics, dopaminergic blockers, beta sympathetic blockers, and, in some drugs, from the groups of tricyclic antidepressants, selective serotonin re-uptake inhibitors, atypical antipsychotic medicines, antiepileptics,

neuropeptides, and eutonics of the gastrointestinal tract [2–8]. However, not only medicines, but many compounds introduced in mega doses to the environment over the last decades by human production, were recognized to be able to act as obesogens. The main route of human exposure is dietary ingestion through contaminated food [9–11]. Also in the last 40 years, the dramatically developing food industry, using new technologies in the production of highly processed foods, can contribute to the development of obesity by changing the quality of food and the increased content of certain nutrients or additives [9].

2. Materials

We followed the current methodological guidelines for systematic reviews to identify, retrieve, and summarize the relevant epidemiological literature on the relation between obesogens and overweightness/obesity, Type 2 diabetes, metabolic syndrome, and atherosclerotic cardiovascular disease [12,13]. Each eligible paper was summarized with respect to the methods and results, with particular attention paid to the study design and exposure assessment. All articles were searched using Medline and Web of Science; we focused on the original articles and excluded doubled articles. We used the following search terms: “obesogens, metabolic disruptors, obesogens in food, food, additives, contaminants, obesity, adipose cells, adipose tissue, metabolic syndrome, systematic low-grade inflammation”.

3. Obesity

Pre-obesity (overweight) and obesity are medical conditions marked by an abnormal and/or excessive accumulation of body fat that presents a risk to health (WHO 2019). According to the last definition, adopted by the European Commission in 2021, obesity is a chronic, relapsing disease, which in turn acts as a gateway to a range of other non-communicable diseases, such as diabetes, cardiovascular diseases, and cancer.

The obesity prevalence has risen exponentially in the world's population over the last 40 years. While in 1975, 6.4% of women and 3.2% of men were obese, the prevalence by 2014 roughly tripled to 14.9 and 10.8%, respectively. According to a prediction, every fifth adult will suffer from obesity in 2025. The global age-standardized mean body mass index (BMI) of children and adolescents aged 5–19 years has also been increased during the evaluated period from 1976 to 2016 in both genders, leading to virtually identical age-standardised mean BMIs for both genders [14].

The obesity pandemic has been probably brought about by dramatic changes in lifestyle during a relatively short period of human evolution. This maladaptation is the result of complex interactions between biological, behavioral, social, and environmental factors that are involved in the regulation of energy balance and fat stores.

In addition to increased mechanical load on the musculoskeletal system and cardiorespiratory load, obesity is a metabolic disease that is associated with dysfunctional white adipose tissue, affected by systematic low-grade inflammation. This leads to chronic systemic inflammation, ectopic fat accumulation in tissues and organs, a pro-coagulative state, endothelial dysfunction, and impaired carbohydrate, lipid, protein, and purine metabolism. It is linked to clinical conditions, such as hypertension, dyslipidemia, Type 2 diabetes mellitus, cardiovascular, and tumor diseases.

The reported estimates for the population-attributable risks of obesity have been shown to range from 5 to 15% for all-cause mortality, from 0.2 to 8% for all-cancer incidence, from 7 to 44% for cardiovascular disease incidence, and from 3 to 83% for Type 2 diabetes mellitus incidence [15]. Obesity is one of the leading causes of death and disability worldwide and is the fourth highest independent cause of premature mortality.

The histopathological unit of dysfunctional adipose tissue is characterized by adipocyte hypertrophy with infiltration of M1 macrophages, as well as impaired adipogenesis, angiogenesis, lipolysis, and de novo lipogenesis in adipose tissue.

4. Adipose Tissue

Adipose tissue is a complex, heterogeneous, and highly dynamic organ, executing the storage of energy and contributing to the control of energy metabolism of the whole organism. It consists of specific cells—mature adipocytes that are differentiated under endocrine stimuli from their mesenchymal stem cell precursors during adipogenesis.

According to the morphology and function of the predominant matured adipocytes three types of adipose depots are recognized in humans: the white (WAT), the brown (BAT), and the beige/brite/brown-like (BAT) adipose tissues. WAT contains adipocytes with a single large unilocular lipid droplet filling most of the cytoplasm and pushing the nucleus and organelles to the margins of the cells. BAT is characterized by smaller-sized adipocytes, with an abundance of smaller lipid droplets and many mitochondria. The third type—BAT—represents a combination of the attributes of previous two. Beige adipocytes are of middle size, have more lipid droplets and fewer mitochondria than BAT. It is supposed that WAT can be transformed into beige adipocytes under thermogenic stimuli [16].

Mature adipocytes are able under neuroendocrine control to store energy in lipid droplets in the form of triglycerides, and release it in the chemical (WAT) or thermal form (BAT) according to the body's requirements. The remaining cells are made up of stromal vascular fraction and belong to the immune, epithelial, vascular, and stromal cells. Besides storage and distribution of energy, adipose tissue contributes to the regulation of systemic energy metabolism by the secretion of adipokines that enables endocrine, paracrine, autocrine, and cross-talk communication with other organs. The physiological production of adipokines requires intact cellular machinery of mature adipocytes, in particular mitochondrial respiration and balance between lipogenesis and lipolysis. As hormones regulate the physiology of these systems, their action can be disrupted by chemicals in the environment that mimic or block normal endocrine functions [17].

Dysregulation of adipocytokines caused by obesity contributes to the pathogenesis of various metabolic and cardiovascular disorders [18].

5. Etiology of Obesity

Obesity and related disorders have become a public health issue [19,20]. As a multifactorial disorder, obesity cannot be linked specifically to one etiology, including genetics or environmental chemicals. While dietary restriction and increased exercise continue to be the most prescribed treatment, the obesity pandemic continues unabated and is increasing worldwide [21]. Despite the voluminous literature on obesogens and metabolism-disrupting chemicals, a series of workshops aimed at identifying the best evidence for the effects of these factors on obesity and diabetes have identified shortcomings in the available data that have prevented a complete and accurate analysis of their impact.

Obesity is most likely caused by (1) imbalance between energy intake and expenditure, resulting in energy surplus (e.g., by consumption of high-calorie diets); (2) genetic predisposition (40–70%), as well as hormonal, environmental, biological, psychological, and sociological factors; (3) lack of physical activity; (4) exposure to obesogens (endocrine disruptors or diabetogens) [22].

6. Obesogens

6.1. The Obesogen Hypotheses

The possible impact of obesogens, originally a highly controversial issue, has been supported by a growing body of evidence. Obesogens include xenobiotics that promote adipogenesis and obesity in animals and humans, such as several medicines or substances acting as endocrine disruptors [23]. Human activities have polluted water, soil, and foods. Obesogens are currently contained in many products for daily use, e.g., personal care products, cosmetics, cleaners, toys, kitchen utensils, plastic curtains and table cloths, soft furnishings, furniture, mattresses, and clothes.

Obesogens are chemicals that directly or indirectly increase fat accumulation and cause obesity [24]. The obesogenic hypothesis further suggests that obesogens can act directly at

the cellular level to increase the commitment or differentiation of adipocytes from stem cells by altering the number of adipocytes, increasing the retention of triglycerides within adipocytes, or modifying the rate of adipocyte proliferation when compared to cell death. Furthermore, obesogens can act indirectly as well by changing basal metabolic rate, shifting energy balance to favor calorie storage, and modulating food intake and metabolism via effects on the adipose tissue, brain, liver, pancreas, muscle, and the gastrointestinal tract [21,22].

To sum up, obesogens promote adipogenesis and fat accumulation, affect appetite control and satiety, and act as endocrine disruptors, possibly changing hormonal regulations [25].

The effects of obesogens can only become apparent later in life [26]. Previous studies have identified obesogens that have the potential to disrupt multiple metabolic signaling pathways in the developing organism, resulting in permanent changes to the adult's physiology. Prenatal or perinatal exposure to obesogenic endocrine-disrupting chemicals has been shown to predispose an organism to store more fat from early life [27].

This suggests that humans, who have been exposed to obesogenic chemicals during sensitive periods of development, might be pre-programmed to store increased amounts of fat, resulting in a lifelong struggle to maintain a healthy weight [24].

In this case, obesogens alone do not cause obesity in humans, but can work behind-the-scenes to promote weight gain, due to the developmental programming of adipose tissue regulation, poor diet, and metabolism [28].

In 2019, a study by Heindel and Blumberg provided strong evidence of the presence of estrogens acting as obesogens in humans. Since 2009 (the study of Newbold et al.), it has been known that the same holds for animals. In previous years, studies have identified transcriptomic and metabolomic changes of polychlorinated biphenyl-126 (PCB-126) in human hepatocytes, HepaRG, that imply the possibly detrimental role of environmental pollutants for the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). These impacts might be precipitated by poor diet and/or a sedentary lifestyle [29]. Biological mechanisms acting in the development of hepatic steatosis are divided into four categories: increased fatty acid uptake, decreased lipid efflux, increased fatty-acid synthesis, and impairment of the oxidative metabolism of these substances [30]. The further elucidation of impaired hepatic lipid metabolism is needed [31]. Animal studies have clarified the impact of obesogens on the etiology of obesity. Currently, they focus on human lipid metabolism. Tissue culture studies are being carried out predominantly on 3T3-L1, derived from mouse cells. The main aims of 3T3-L1 studies are the clarification of the obesogenic potential of xenobiotics and their metabolites, as well as the assessment of their impact on adipose differentiation. Xenobiotics may increase the number of differentiated 3T3-L1 pre-adipocytes and enhance their capacity for droplet storage. The mechanism behind is most probably the up-regulation of transcription factors CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). These are associated with significantly higher expression of fatty-acid-binding protein 4 adipokine [32].

PPAR is a ligand-activated transcription factor, which is responsible for the growth and development of adipose tissue and that acts as the receptor for antidiabetic drugs such as rosiglitazone [33,34]. Neither the mechanism nor the modification of the key cellular processes lying between induction of the receptor and onset of the disease have been described [35,36].

The most common contaminants that are considered to be potential obesogens include estrogens, such as diethylstilboestrol and genistein; organotins, e.g., tributyltin; fluoroactanoates; bisphenol A; diethylhexyl phthalate. These chemicals directly alter endocrine function and metabolic organs that control lipid homeostasis (e.g., the liver), suggesting that exposure might be a risk factor for the development of NAFLD [22,23,37–39].

In 2015, the Parma consensus broadened the definition of obesogens to include endocrine disrupting chemicals that affect other obesity-related metabolic conditions that drive metabolic syndrome, such as insulin resistance, hypertension, dyslipidemia, and

hyperglycemia [17]. This class of endocrine-disrupting chemicals was denoted as being metabolism-disrupting chemicals [40].

6.2. Overview of Obesogens

Presence in foods

1. Naturally occurring obesogens

Fructose
Genistein

2. Xenobiotics

2.1 Contaminants

Pharmaceuticals

Diethylstilbesterol
Estradiol
Rosiglitazone

Organic Pollutants (OP's)

Industrial Chemicals

Bisphenol A (BPA)
Organotins
Perfluorooctanoic Acid (PFOA)
Phthalates
Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)
Polychlorinated Biphenyl Ethers (PCBs)

Organophosphate Pesticides

Chlorpyrifos
Diazinon

Organophosphate Pesticides

Dichlordifenyltrichlorethan (DDT),
Dichlordifenyltrichlorethan (DDT),

Other Environmental Pollutants

Benzo[a]pyrene
Fine Particulate Matter (PM_{2.5})
Triclosan

2.2. Additives

1. Naturally occurring obesogens

Fructose

Fructose, a monosaccharide present in fruits and honey, promotes the development of obesity easier than glucose. Its overconsumption contributes to the increasing prevalence of obesity, insulin resistance, and metabolic as well as cardiovascular diseases [41]. Fructose is capable to affect the intestinal microflora with increased intestinal permeability [42]. Fructose-2,6-bisphosphate derived from fructose-6-phosphate has been identified as one of the signaling metabolites responsible for glucose-induced recruitment of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) to its target genes. ChREBP promotes *de novo* lipogenesis in liver and adipose tissue [43,44].

Due to the different metabolism and high lipogenic potential by fructose when compared to glucose, fructose ingestion precipitates the accumulation of excessive fat in the liver and results in weight gain and abdominal obesity [45].

Recently, fructose has become overabundant in the food industry, especially in the case of non-alcoholic sweetened beverages and sweets.

Genistein (in soy)

Phytoestrogens, contained in various foods and food supplements, in particular soy products, are another prominent class of chemicals. Genistein and daidzein are two of the most abundant phytoestrogens in the human diet. For its estrogenic activity, genistein has been proposed to have a role in preserving good health by regulating lipid and carbohydrate homeostasis [46]. Genistein is also used as a supplement for menopausal

woman. However, a recent study showed that only at high doses did genistein indeed inhibit adipose deposition, but, at low doses similar to that found in Western and Eastern diets, in soy milk or in food supplements containing soy, it surprisingly induced adipose tissue deposition, especially in males. Further, this increase in adipose tissue deposition by genistein was correlated with mild peripheral insulin resistance. Interestingly, genistein did not significantly affect food consumption [47] suggesting an abnormal programming of factors involved in weight homeostasis [48].

2. Xenobiotics

Xenobiotics are not natural compounds found in foods and are not used as separate foods. The presence of xenobiotics in foods, according to the dose, can be harmful to humans.

Substances that are not naturally occurring compounds of foods are called foreign substances. Foreign substances or xenobiotics are classified either as contaminants or as additives.

2.1. Contaminants

Substances contaminating foods unintentionally, not posing a risk in usual concentrations but being potentially harmful at higher doses, are called contaminants. They can contaminate food. Contamination may occur at each step of the production chain.

The most common causes of contamination are: the use of veterinary drugs, contaminated soil from environmental pollution, persistent organic pollutants for agricultural purposes, sanitary materials, radioactive contaminants, traffic pollutants, and contamination from packaging materials.

Substances contained in packaging materials, such as phthalic acid, are used as a softener.

The primary contaminants of high concentration include toxic metals, above all being lead, mercury, cadmium, and inorganic chemicals, e.g., nitrous and nitric oxide.

2.1.1. Pharmaceuticals

Some pharmaceuticals used in veterinary medicine and in animal production may act as possible obesogens in humans:

Diethylstilbesterol (DES)

This is an estrogen that was prescribed to millions of women from 1940–1971 to prevent abortion in the first trimester of pregnancy. The prescription has been suspended due to adverse side effects, but the drug is still being used to enhance fertility in livestock and, therefore, enters the food chain. DES may have acted as an obesogen in the human population [49].

2.1.2. Organic pollutants (OPs)

These toxic and carcinogenic chemicals are very resistant to degradation and many of the products of their decomposition are toxic as well. The greatest risk stems from their ability to accumulate in the food chain. The main source of OPs are animal foods (meat, fatty fish, dairy products, and eggs).

2.1.2.1. Industrial chemicals

Bisphenol A (BPA)

BPA is one of the highest-volume chemicals used in commerce. Its omnipresence in polycarbonate plastics, epoxy resins (automobile parts, safety protective equipment, food and water containers, baby bottles, or the protective lining inside metal food cans, dental fillings, etc.), and thermopaper contributes to continuous human exposure [50,51]. Dietary ingestion is suspected to be the main route for human exposure, although dermal exposure can also occur from skin contact with thermal paper. BPA has been detected at measurable concentrations in the urine samples of almost all persons tested worldwide. In addition, BPA has been detected in placental and amniotic fluids and human breast milk (Blumberg 2021).

BPA is an endocrine disruptor exhibiting estrogen-like activity that is able to affect the regulation of leptin and insulin production, and thus acts as an agonist and antagonist of PPAR γ [52].

Many studies clearly support the enhancement of adipogenesis, dysregulation of adipocytes and glucose, and the inflammatory changes of adipose tissue resulting from BPA, resulting in obesity [53,54].

A systematic review with a meta-analysis of the epidemiological evidence, given by Wu et al., has revealed a positive correlation between the level of BPA and obesity risk. A dose-response analysis revealed that a 1 ng/mL increase in BPA increased the risk of obesity by 11%. There were similar results for different types of obesity, gender, and age [55].

Due to its adverse effects on human health, the European food safety authority (EFSA) has determined the tolerable daily intake of BPA (4 μ g per kilogram of body weight per day) [56]. Today, there is a growing tendency to replace BPA with its analogues. This is based on legal limits for BPA in basic goods. In 2019, a longitudinal cohort study revealed a significant association of bisphenol S (BPS) and bisphenol F (BPF) with obesity in children aged 6 to 19 when compared to total bisphenol and BPA. The replacement of BPA with other bisphenols therefore might not be efficient [57].

Organotins (OTs)

These are chemicals widely used as pesticides, disinfectants, and biocides in paints. OTs are harmful to endocrine glands and can interfere with neuroendocrine control, hormone synthesis and/or the biological availability or activity of target receptors. They impair metabolism either centrally (lateral hypothalamus) or peripherally (adipose tissue) and result in obesity. Besides their obesogenic effects, OTs affect reproductive organs [58,59]. Due to their physical and chemical properties, OTs easily enter food chains and produce tributyltin (TBT) and triphenyltin, which are both severely toxic [60,61].

The most common OTs include TBT. Pilot studies have shown a positive correlation between placental TBT concentration and weight gain in infants [62,63]. Humans are exposed to TBT in seafood, foods treated with agricultural fungicides and miticides, industrial waters, textile material, polyvinyl chloride stabilized with TBT, or food packaging. Indirectly, house dust, which contains significant amounts of TBT, can be the source of contamination [64,65].

Perfluorooctanoic Acid (PFOA)

This is a group of synthetic chemicals that is used for their high resistance and stability. They are intermediates of Teflon production, and are commonly found in the environment. The route of exposure is mostly the digestive tract.[4] Evidence supports the obesogenic effect of PFOA, though its biological mechanism needs further clarification. A study by Lia et al. (2020) demonstrated that the obesogenic effect of PFOA was the result of a combination of many enzymatic pathways with insulin signaling [66]. In 2022, a study supporting previous findings suggested that PFOA might act as a developmental obesogen, transmitted vertically via the placenta [67].

Phthalates

Phthalates or phthalic esters form a group of chemicals that are used as softeners for plastics, additives for cosmetics, insecticides, or as adhesives. They can be detected in breast milk and enter foods from packaging materials, including package water and spirits, but they are particularly present in fatty foods, because they are lipophilic. In addition, toys containing phthalates can enter the organism when placed into the mouth [68]. Phthalates are one of the most studied metabolic disruptors. Several observational studies suggested that phthalates could be determinant in the pathogenesis of obesity [69]. Phthalates act as thyroid hormone agonists as well as androgen agonists. Thus, they can affect adipogenesis, fat accumulation, and insulin resistance by interfering with PPAR activation [70]. A recent study from 2020 suggests an association of child growth with prenatal exposure to phthalates, especially those of low molecular weight.[71] Furthermore, in the case of chronic exposure to low doses of phthalates, adverse effects (spermiotoxic, embryotoxic,

and teratogenic) on the reproductive system were observed, as well as hepatotoxicity and nephrotoxicity [68,72].

Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)

PBDEs were used as flame retardants in plastics, electronics, vehicles, households, furniture, textile material, and building materials. Several studies showed an association between PBDEs and foods, as they were detected in butter, fish, and other products high in animal fat [73]. Despite a production ban due to adverse effects on human health, the use of reserves is still allowed. One of the most common PBDEs is PBDE 99, which can be detected the most in adipose tissue, especially white adipose tissue [74,75]. An epidemiological study demonstrated a positive correlation between early exposure to PBDEs and increased adiposity at the age of 8 years [76]. This has been confirmed at the cellular level with PBDE 99 and the adipocyte lineage of C3H10T1/2 [77]. These studies support the obesogenic effect of PBDEs. In addition to a pro-adipogenic effect in cell cultures 3T3-L1, they increase fat accumulation, as well as C/EBP α and PPAR γ expression, in the course of differentiation [78].

Polychlorinated Biphenyl Ethers (PCBs)

This is a group of fat-soluble chemicals that differ from each other in the number and position of chlorine bound to the biphenyl. There are 2010 PCB congeners. Due to their industrial use in paints, varnishes, plastics, pesticides, and coolants, they have entered the environment and foods. Long-term consumption of food containing high amounts of PCBs might be hazardous [26,79]. These are especially milk, fish, and animal foods. Animal products are contaminated via agricultural premises that have not removed paint used before 1986, before the use of PCBs was banned [80]. Animal studies suggest that PCBs promote the differentiation of adipocytes and PPAR expression, resulting in weight gains in offspring [25]. The obesogenic effect of PCBs is discussed in many studies [81]. Valvi et al. demonstrated that PCB concentration in cord blood was associated with BMI and overweightness in children at the age of 5, 6.5, and 7 years, showing a more profound effect in girls [82,83].

2.1.2.2. Organophosphate Pesticides (OPPs)

More than 100 various organophosphates have been described. OPPs pertain to the most commonly used pesticides worldwide and their use in agricultural premises has rapidly increased. The World Health Organization (WHO) has designated OPPs as being extremely hazardous [84,85].

Chlorpyrifos (CPF)

This is an organophosphate pesticide widely used in agriculture and, therefore, has entered the environment. Today, studies on mice 3T3-L1 models are being carried out and a study by Blanco et al. suggests that CPF and its metabolite 3,5,6-trichloropyridinol (TCP) affect metabolism during adipogenesis, by increasing the number of differentiated 3T3-L1 adipocytes and the capacity for storage of lipid droplets. This process is linked to an up-regulation of the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) and PPAR γ , which is accompanied by a significantly higher expression of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) adipokine [86,87].

Diazinon

This pesticide and nematocide was widely used in agriculture and commonly detected in the human population. Residues of diazinon were also detected in ground water and drinking spring water [88]. Via inhibition of acetylcholinesterase, diazinon elicits neurotoxicity. Its pro-adipogenic effect has been shown in a study on mice 3T3-L1, where the accumulation of lipid droplets and the activation of proadipogenic signaling pathways were related to the concentration of diazinon. Diazinon significantly induced the protein expression of the transcription factors CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α) and PPAR γ , as well as their downstream proteins, fatty-acid synthase (FASN), acetyl CoA carboxylase, lipoprotein lipase, adiponectin, perilipin, and fatty-acid binding protein 4 (FABP4) [89].

2.1.2.3. Organochlorinated Pesticides (OCPs)

Dichlordifenyiltrichloreten (DDT),

Dichlorethylendichlordiphenyldichlorethylen (DDE)

The insecticide DDT was used on a large scale from 1939 against mosquitos *Anopheles funestus*, a vector of malaria. After its toxicity had been demonstrated, DDT was banned for use. There are exceptions to this rule, especially in developing countries that are fighting malaria. Problems with DDT and its products of degradation have continued until today because of its continuous presence in the environment. Due to its persistence, DDT has entered the food chain and has often been detected in animal adipose tissue and water. The largest part of DDT and its metabolites enter the human organism via the consumption of meat, dairy products, and fish. Leafy vegetables are usually richer in DDT when compared to other kinds of vegetables. Breast-feeding is another important form of human exposure. A growing amount of epidemiological evidence, in both in vivo and in vitro studies, have associated persistent organic pollutants, such as DDT and the DDT metabolite p,p'-DDE, with obesity [90–93]. Acute exposure causes harm to the central nervous system, while chronic exposure can result in liver cancer, disruption of endocrine control, harm of the fetus and fertility, and increased risk of Type 2 diabetes. DDT and especially its metabolite DDE may pose a risk of developing obesity in later life [94]. Rodents exposed to DDT during prenatal life have been found to have decreased energy expenditure along with glucose intolerance, dyslipidemia, and hyperinsulinemia [95].

2.1.2.4. Other Environmental Pollutants

Benzo(a)pyrene

This is a polycyclic aromatic carbohydrate present in smoke and a proven carcinogenic chemical that is produced in the course of burning, grilling, or smoking foods [96]. Its anti-adipogenic effect via the aryl hydrocarbon receptor has been demonstrated on cell cultures of human preadipocytes [97,98].

Triclosan

This is a commonly used antibacterial agent, present in oral care waters, toothpastes, toothbrushes, antibacterial soap, washing powder, and kitchen breadboards. Exposure to triclosan and triclocarban has been linked to an elevated risk of child obesity [99]. Animal studies show a correlation between high levels of triclosan and estrogens, androgens, and thyroid hormones. Human stem cell culture models have demonstrated an anti-adipogenic effect, including a lower production of adiponectin and lipoprotein lipase (i.e., markers of cellular fat), which is correlated to the concentration of the chemical [100].

Fine Particulate Matter (PM_{2.5})

In previous decades, particulate pollution has become a growing health issue worldwide, especially in the northern and north-western regions of China [101]. Motor transportation has considerably contributed to the concentration of PM in urban areas, as well as biomass, other waste, or industrial burning or road dust [102]. Several studies have shown an association between air pollution and the risk of obesity, predominantly in the male population [103].

2.2. Additives

Commonly used additives have been linked to obesity. These substances include the emulsifiers carboxymethylcellulose and P-80, the surfactants DOSS and Span-80, the preserving agent 3-tert-butyl 4-hydroxyanisole (3-BHA), artificial sweeteners, and the flavor enhancer monosodium glutamate (MSG) [104–106]. More than 350 additives have been approved in the European Union and we have focused only on examples of the most discussed.

Monosodium glutamate

This is a chemical eliciting the secretion of glucagon-like peptide-1, a hormone controlling appetite and satiety, and/or antagonization of the androgen receptor [107,108]. That MSG contributes to the early onset of obesity has been demonstrated in animal studies. Mice administered with MSG postnatally showed a significantly increased proportion of

fat in both sexes. MSG administered postnatally to mice acted as a neurotoxic agent on the hypothalamic arcuate nucleus, leading to obesity [109,110].

These findings represent a promising outlook for future research, as they draw attention to the consequences of a highly processed diet.

Carrageenan

This is a hydrocolloid substance, commonly present in chocolate milk and ice cream, that is able to impair glucose tolerance, increase insulin resistance, and inhibit insulin signaling in in vivo mouse liver cells and human HepG2 cells. A study on mice from 2021 showed a significant change in gene expression related to lipid metabolism, especially in the decreased gene levels of adipocytokines, lipogenesis, lipid absorption, and transport, and the increased genes for adipolysis and oxidation after carrageenan exposure [111,112].

Antioxidants

Foods often contain antioxidants, such as the preserving agent sodium sulphite, sodium benzoate, natural coloring agents, and curcumin. Oxidative stress, caused by the consumption of additive artificial antioxidants in foods at a younger age, has been associated with the development of adiposity in later life.

Lower leptin secretion in mouse adipocytes 3T3-L1 after incubation with LPS mimicked inflammation in obesity, i.e., consuming antioxidant additives might lead to lower leptin secretion and contribute to the obesogenic environment [113,114].

All mentioned obesogens have been shown in Table 1.

Table 1. Obesogens and their effect on human health.

		Obesogens	Obesogenic Effect	Health Impact	
Naturally occurring obesogens		Fructose	Different fructose metabolism and high lipogenic potential = excessive fat storage in the liver, weight gain of visceral adipose tissue. In fetal, neonatal and infant development, high exposure to fructose as an obesogen can affect lifelong neuroendocrine function, appetite control, eating behavior, adipogenesis, fat distribution [45].	obesity, insulin resistance, metabolic and cardiovascular diseases	
		Genistein	At high (pharmacological) doses it inhibits adipose tissue deposition, but at low doses (normal concentration in soy) it induces adipose tissue deposition, especially in men. The genistein regulate estrogen and progesterone receptors [47].	Obesity, mild peripheral insulin resistance	
		Obesogens	Obesogenic Effect	Health Impact	
Xenobiotics	Contaminants	Pharmaceuticals	Diethylstilbesterol	Endocrine disruptor with abnormal programming of various differentiating estrogen-target tissues [49].	Potential obesogen
			Estradiol	Estradiol in combination with a diet rich in fats and sugars causes variability in estrogen-induced gene expression in the dorsal raphe [7].	Potential obesogen
			Rosiglitazone	Rosiglitazone reduces hyperlipidemia and hyperglycemia, improves insulin sensitivity and decreases serum lipids, but does increase adipogenesis and lipid accumulation in tissues including liver triglyceride accumulation and hepatic steatosis [6].	Potential obesogen

Table 1. Cont.

Industrial chemicals	Bisphenol A (BPA)	Endocrine disruptor, it is able to affect regulation of leptin and insulin secretion (PPAR γ agonist and antagonist) [50].	Supports adipogenesis, dysregulation of adipocytes and glucose, inflammation of adipose tissue \rightarrow obesity
	Organotins (OTs)	OTs can damage the endocrine glands, interfering with neurohumoral control of endocrine function involves changes in the mechanism of adipose tissue [58].	Predisposition to obesity, metabolic disorders, and effects on reproductive organs
	Perfluorooctanoic Acid (PFOA)	PFOA can cause aberrant lipid metabolism in male offspring, insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease, with influencing PPAR γ signaling pathway [66,115].	Obesity, hepatic inflammation, disorders of lipid metabolism, disruption of gut barrier integrity in male offspring
	Phthalates (di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-butyl phthalate (DBP), benzylbutyl phthalate (BBP) and possibly also di-isononyl phthalate (DINP), di-isodecyl phthalate (DIDP) and di(n-octyl)-phthalate (DNOP)	Phthalates can cause insulin resistance, increase endoplasmic reticulum expression, disruption of glucocorticoid signaling in mesangial cells and preadipocytes [70].	Predisposition to obesity and metabolic diseases can influence metabolic regulation by disrupting the homeostasis of thyroid hormones
	Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)	PBDEs are insulin disruptors, isoproterenol stimulates the metabolism of adipocytes [116–118].	Predisposition to obesity, insulin resistance in obese individuals
	Polychlorinated Biphenyl Ethers (PCBs)	PCBs are lipophilic toxicants into adipocytes. In particular, the degree of halogenation or the number and position of chlorine substituents on PCBs affects their uptake and accumulation in adipocytes [119].	Predisposition to obesity, metabolic disorders (disruption of adipose tissue function)
Organophosphate pesticides	Chlorpyrifos	Chlorpyrifos can cause an increasing number of differentiate 3T3-L1 adipocytes and the capacity for storage of lipid droplets due to up-regulation of transcription factors CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) and PPAR γ , which is accompanied by significantly higher expression of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) adipokin [86].	Metabolic disorders, obesity
	Diazinon	Via inhibition of acetylcholinesterase, diazinon elicits neurotoxicity, significantly induces protein expression of transcription factors CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α) and PPAR γ as well as their downstream proteins, fatty-acid synthase (FASN), acetyl CoA carboxylase, lipoprotein lipase, adiponectin, perilipin, and fatty-acid binding protein 4 [89].	Obesity, neurotoxicity

Table 1. Cont.

Organochlorinated pesticides	Dichlordifenyiltrichloretan (DDT), Dichlorethylendichlordiphenyldichlorethylen (DDE)	DDT, DDE can cause disruption of endocrine control, glucose intolerance, dyslipidemia, and hyperinsulinemia [120].	Acute exposure causes harm to the central nervous system, while chronic exposure can result in liver cancer, obesity, harm for the fetus and fertility and increased risk of Type 2 diabetes
	Benzo[a]pyrene	It can be originator cytotoxicity and expression of inflammation markers [121].	Predisposition to obesity, non-alcoholic fatty acid disease, asthma, hepatic steatosis
	Fine Particulate Matter (PM _{2.5})	PM _{2.5} may cause adipose tissue inflammation [103].	Risk of obesity, predominantly in the male population
Other environmental pollutants	Triclosan	Animal studies show a correlation between high levels of triclosan and estrogens, androgens and thyroid hormones [100].	Risk of obesity
	Monosodium glutamate	It induces the secretion of glucagon-like peptide-1, a hormone controlling appetite and satiety, and/or antagonization of the androgen receptor, act as a neurotoxic agent on hypothalamic arcuate nucleus and lead to obesity [107,108].	Obesity
Additives	Carrageenan	Is able to affect glucose tolerance, increase insulin resistance and inhibit insulin signaling in in vivo mouse liver cells and human HepG2 cells, promote significant changes in gene expression related to metabolism and lowering of adipokine genes, as well as lipogenesis, absorption, and transport of lipids. Adipolysis and oxidation increase [111,112].	Predisposition to obesity
	Antioxidants	Consuming antioxidant additives might lead to lower leptin secretion and contribute to the obesogenic environment [113,114].	Predisposition to obesity

7. Obesogen Elimination Method

The common occurrence of obesogens with which humans are in regular contact should be limited. Because humans are already heavily exposed to environmental obesogens in the form of plastics, pesticides, herbicides, industrial products, and personal care products, compounds intentionally added to foods, such as certain artificial sweeteners, phytoestrogens, preservatives, added sugars (e.g., corn syrup with a high fructose content) deserve special attention. Furthermore, it has already been proven that many obesogens are found in animals and their products, which we then use as food [106–111].

Another way to eliminate obesogens is to consume organic products that are not treated with pesticides, fungicides, and other sources of obesogens. Fruits and vegetables

are commonly treated with fungicides that have been identified as obesogens, such as glyphosate used on corn, wheat, and rice [122–124].

Food processors also deal with the issue of obesogens. Studies are being sought looking for methods of eliminating obesogens from food. For example, Rezaei et al. published a study in 2021 to remove the pesticide diazinon from apple juice and found a successful solution using fermentation with the cultivated bacterium *Lactobacillus acidophilus*, where the product is stored in the cold for 28 days after fermentation and the diazinon is completely removed [125].

8. Conclusions

The study of obesogenic compounds in food is still in its early phase, and people are constantly exposed to obesogens, either directly from food or contaminated food. Regarding the objectives of food industry technologies, i.e., the extension of expiration dates, cost reduction, the best attainable palatability, optimization of production effectiveness, and food safety in terms of the absence of pathogens, over 4000 new substances have entered into foods. In most of the new substances, their impact on overall metabolic homeostasis remain unknown. Many of these xenobiotics may, as obesogens, cause epigenetic, central regulatory pathway, and endocrine-disrupting changes, directly or indirectly promoting adipogenesis and obesity in humans, influencing individuals or their progeny. Many of them may also crossroad or modulate the effect of endogenous ligands of nuclear or non-nuclear transcription factors, participating in differentiation, metabolism, and the secretory function of adipocytes. Metabolism-disrupting chemicals may affect other obesity-related metabolic conditions that drive metabolic syndrome, such as insulin resistance, hypertension, dyslipidemia, and hyperglycemia.

Confirmation of the effect of obesogens at the current exposure concentrations for the general population still requires a larger number of scientific studies to support better management of these chemicals in our environment, and to decrease human exposure.

The biological effects of main obesogenic candidates can be correctly analyzed to obtain data to advocate for the requirement to revise their regulation. Efforts should be made to better regulate the production of these obesogens and metabolic disruptors, their use and, therefore, decrease environmental and food contamination. In addition, new approaches and ways to minimize their obesogenic, and especially metabolic-disrupting, potential in humans should be under investigation, which could help to develop an efficient strategy to reverse the increasing trend of the obesity pandemic.

Funding: This research was funded by the Cooperatio No. 207032—Immunity and Infection; by the project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267; “Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)” No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267; Charles University Research Fund (Progress Q39), by the National Sustainability Program I (NPU I) Nr. LO1503 provided by the MEYS CR.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Müllerová, D.; Kopecký, J. White Adipose Tissue: Storage and Effector Site for Environmental Pollutants. *Physiol. Res.* **2007**, *56*, 375–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. D’eon, J.C.; Mabury, S.A. Production of Perfluorinated Carboxylic Acids (PFCAs) from the Biotransformation of Polyfluoroalkyl Phosphate Surfactants (PAPS): Exploring Routes of Human Contamination. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4799–4805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ellis, D.A.; Martin, J.W.; Silva, A.O.D.; Mabury, S.A.; Hurley, M.D.; Andersen, M.P.S.; Wallington, T.J. Degradation of Fluorotelomer Alcohols: A Likely Atmospheric Source of Perfluorinated Carboxylic Acids. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 3316–3321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Fujii, Y.; Harada, K.H.; Koizumi, A. Occurrence of Perfluorinated Carboxylic Acids (PFCA) in Personal Care Products and Compounding Agents. *Chemosphere* **2013**, *93*, 538–544. [\[CrossRef\]](#)
5. Kimura, O.; Fujii, Y.; Haraguchi, K.; Kato, Y.; Ohta, C.; Koga, N.; Endo, T. Effects of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids on the Uptake of Sulfobromophthalein via Organic Anion Transporting Polypeptides in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *24*, 100807. [\[CrossRef\]](#)
6. Watkins, S.M.; Reifsnnyder, P.R.; Pan, H.; German, J.B.; Leiter, E.H. Lipid Metabolome-Wide Effects of the PPAR γ Agonist Rosiglitazone. *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 1809–1817. [\[CrossRef\]](#)
7. Betha, C.L.; Mueller, K.; Reddy, A.P.; Kohama, S.G.; Urbanski, H.F. Effects of Obesogenic Diet and Estradiol on Dorsal Raphe Gene Expression in Old Female Macaques. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178788. [\[CrossRef\]](#)
8. Grün, F.; Blumberg, B. Minireview: The Case for Obesogens. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 1127–1134. [\[CrossRef\]](#)
9. Swedenborg, E.; Rüegg, J.; Mäkelä, S.; Pongratz, I. Endocrine Disruptive Chemicals: Mechanisms of Action and Involvement in Metabolic Disorders. *J. Mol. Endocrinol.* **2009**, *43*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
10. Diamanti-Kandarakis, E.; Bouguignon, J.-P.; Giudice, L.C.; Hauser, R.; Prins, G.S.; Soto, A.M.; Zoeller, R.T.; Gore, A.C. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* **2009**, *30*, 293–342. [\[CrossRef\]](#)
11. Coster, S.D.; Larebeke, N.V. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *J. Environ. Public Health* **2012**, *2012*, 713696. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *J. Clin. Epidemiol.* **2009**, *62*, 1006–1012. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Shea, B.J.; Grimshaw, J.M.; Wells, G.A.; Boers, M.; Andersson, N.; Hamel, C.; Porter, A.C.; Tugwell, P.; Moher, D.; Bouter, L.M. Development of AMSTAR: A Measurement Tool to Assess the Methodological Quality of Systematic Reviews. *BMC Med. Res. Methodol.* **2007**, *7*, 10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Lyn, R.; Heath, E.; Dubhashi, J. Global Implementation of Obesity Prevention Policies: A Review of Progress, Politics, and the Path Forward. *Curr. Obes. Rep.* **2019**, *8*, 504–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Flegal, K.M.; Panagiotou, O.A.; Graubard, B.I. Estimating Population Attributable Fractions to Quantify the Health Burden of Obesity. *Ann. Epidemiol.* **2015**, *25*, 201–207. [\[CrossRef\]](#)
16. Cedikova, M.; Kripnerová, M.; Dvorakova, J.; Pitule, P.; Grundmanova, M.; Babuska, V.; Mullerova, D.; Kuncova, J. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 6067349. [\[CrossRef\]](#)
17. Heindel, J.J.; Newbold, R.; Schug, T.T. Endocrine Disruptors and Obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 653–661. [\[CrossRef\]](#)
18. Ouchi, N. Adipocytokines in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* **2016**, *23*, 645–654. [\[CrossRef\]](#)
19. Janesick, A.S.; Shioda, T.; Blumberg, B. Transgenerational Inheritance of Prenatal Obesogen Exposure. *Mol. Cell Endocrinol.* **2014**, *398*, 31–35. [\[CrossRef\]](#)
20. World Health Organization: Regional Office for Europe. *European Health Report 2018: More than Numbers, Evidence for All*; WHO regional office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2019; ISBN 978-92-4-069876-5.
21. Heindel, J.J.; Blumberg, B. Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 89–106. [\[CrossRef\]](#)
22. Grün, F.; Blumberg, B. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology* **2006**, *147*, s50–s55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Newbold, R.R.; Padilla-Banks, E.; Jefferson, W.N. Environmental Estrogens and Obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* **2009**, *304*, 84–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Merrill, M.L.; Birnbaum, L.S. Childhood Obesity and Environmental Chemicals. *Mt. Sinai J. Med. A J. Transl. Pers. Med.* **2011**, *78*, 22–48. [\[CrossRef\]](#)
25. Liu, G.; Dhana, K.; Furtado, J.D.; Rood, J.; Zong, G.; Liang, L.; Qi, L.; Bray, G.A.; DeJonghe, L.; Coull, B.; et al. Perfluoroalkyl Substances and Changes in Body Weight and Resting Metabolic Rate in Response to Weight-Loss Diets: A Prospective Study. *PLoS Med.* **2018**, *15*, e1002502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Braun, J.M.; Gennings, C.; Hauser, R.; Webster, T.F. What Can Epidemiological Studies Tell Us about the Impact of Chemical Mixtures on Human Health? *Environ. Health Perspect.* **2016**, *124*, A6–A9. [\[CrossRef\]](#)
27. Janesick, A.S.; Blumberg, B. Obesogens: An Emerging Threat to Public Health. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *214*, 559–565. [\[CrossRef\]](#)
28. Eriksson, D.; Ammann, K.; Chassy, B.; Chawade, A. Comments on Two Recent Publications on GM Maize and Roundup. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13338. [\[CrossRef\]](#)
29. Angrish, M.M.; McQueen, C.A.; Cohen-Hubal, E.; Bruno, M.; Ge, Y.; Chorley, B.N. Editor's Highlight: Mechanistic Toxicity Tests Based on an Adverse Outcome Pathway Network for Hepatic Steatosis. *Toxicol. Sci.* **2017**, *159*, 159–169. [\[CrossRef\]](#)
30. Foulds, C.E.; Treviño, L.S.; York, B.; Walker, C.L. Endocrine-Disrupting Chemicals and Fatty Liver Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 445–457. [\[CrossRef\]](#)
31. Choi, S.-I.; Kwon, H.-Y.; Han, X.; Men, X.; Choi, Y.-E.; Jang, G.-W.; Park, K.-T.; Han, J.; Lee, O.-H. Environmental Obesogens (Bisphenols, Phthalates and Parabens) and Their Impacts on Adipogenic Transcription Factors in the Absence of Dexamethasone in 3T3-L1 Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *214*, 105994. [\[CrossRef\]](#)
32. Ruiz-Ojeda, F.; Rupérez, A.; Gomez-Llorente, C.; Gil, A.; Aguilera, C. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1040. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Mohajer, N.; Du, C.Y.; Checkicco, C.; Blumberg, B. Obesogens: How They Are Identified and Molecular Mechanisms Underlying Their Action. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 780888. [CrossRef] [PubMed]
34. Cipolletta, D.; Feuerer, M.; Li, A.; Kamei, N.; Lee, J.; Shoelson, S.E.; Benoist, C.; Mathis, D. PPAR- γ Is a Major Driver of the Accumulation and Phenotype of Adipose Tissue Treg Cells. *Nature* **2012**, *486*, 549–553. [CrossRef]
35. Zuo, Z.; Chen, S.; Wu, T.; Zhang, J.; Su, Y.; Chen, Y.; Wang, C. Tributyltin Causes Obesity and Hepatic Steatosis in Male Mice. *Environ. Toxicol.* **2011**, *26*, 79–85. [CrossRef]
36. Hines, E.P.; White, S.S.; Stanko, J.P.; Gibbs-Flournoy, E.A.; Lau, C.; Fenton, S.E. Phenotypic Dichotomy Following Developmental Exposure to Perfluorooctanoic Acid (PFOA) in Female CD-1 Mice: Low Doses Induce Elevated Serum Leptin and Insulin, and Overweight in Mid-Life. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *304*, 97–105. [CrossRef]
37. Rubin, D.B. Estimating the Causal Effects of Smoking. *Stat. Med.* **2001**, *20*, 1395–1414. [CrossRef] [PubMed]
38. Petrakis, D.; Vassilopoulou, L.; Mamoulakis, C.; Psycharakis, C.; Anifantaki, A.; Sifakis, S.; Docea, A.; Tsiaoussis, J.; Makriganakis, A.; Tsatsakis, A. Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 1282. [CrossRef]
39. Heindel, J.J.; Saal, F.S.V.; Blumberg, B.; Bovolin, P.; Calamandrei, G.; Ceresini, G.; Cohn, B.A.; Fabbri, E.; Gioiosa, L.; Kassotis, C.; et al. Parma Consensus Statement on Metabolic Disruptors. *Environ. Health* **2015**, *14*, 54. [CrossRef]
40. Tappy, L. Fructose-Containing Caloric Sweeteners as a Cause of Obesity and Metabolic Disorders. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb164202. [CrossRef]
41. Alemán, J.O.; Henderson, W.A.; Walker, J.M.; Ronning, A.; Jones, D.R.; Walter, P.J.; Daniel, S.G.; Bittinger, K.; Vaughan, R.; MacArthur, R.; et al. Excess Dietary Fructose Does Not Alter Gut Microbiota or Permeability in Humans: A Pilot Randomized Controlled Study. *J. Clin. Trans. Sci.* **2021**, *5*, e143. [CrossRef]
42. Ke, H.; Luan, Y.; Wu, S.; Zhu, Y.; Tong, X. The Role of Mondo Family Transcription Factors in Nutrient-Sensing and Obesity. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 653972. [CrossRef]
43. Arden, C.; Tudhope, S.J.; Petrie, J.L.; Al-Oarzi, Z.H.; Cullen, K.S.; Lange, A.J.; Towle, H.C.; Agius, L. Fructose 2,6-Bisphosphate Is Essential for Glucose-Regulated Gene Transcription of Glucose-6-Phosphatase and Other ChREBP Target Genes in Hepatocytes. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 111–123. [CrossRef] [PubMed]
44. Goran, M.I.; Dumke, K.; Bouret, S.G.; Kayser, B.; Walker, R.W.; Blumberg, B. The Obesogenic Effect of High Fructose Exposure during Early Development. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9*, 494–500. [CrossRef] [PubMed]
45. Park, J.H.; Jeong, H.J.; Lumen, B.O.D. Contents and Bioactivities of Lunasin, Bowman–Birk Inhibitor, and Isoflavones in Soybean Seed. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7686–7690. [CrossRef] [PubMed]
46. Penza, M.; Montani, C.; Romani, A.; Vignolini, P.; Pampaloni, B.; Tanini, A.; Brandi, M.L.; Alonso-Magdalena, P.; Nadal, A.; Ottobri, L.; et al. Genistein Affects Adipose Tissue Deposition in a Dose-Dependent and Gender-Specific Manner. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5740–5751. [CrossRef] [PubMed]
47. Newbold, R.R.; Padilla-Banks, E.; Jefferson, W.N.; Heindel, J.J. Effects of Endocrine Disruptors on Obesity. *Int. J. Androl.* **2008**, *31*, 201–208. [CrossRef]
48. Harris, R.M.; Waring, R.H. Diethylstilboestrol—A Long-Term Legacy. *Maturitas* **2012**, *72*, 108–112. [CrossRef]
49. Nunes, H.C.; Scarano, W.R.; Deffune, E.; Felisbino, S.L.; Porreca, L.; Delella, E.K. Bisphenol a and Mesenchymal Stem Cells: Recent Insights. *Life Sci.* **2018**, *206*, 22–28. [CrossRef]
50. Calafat, A.M.; Ye, X.; Wong, L.-Y.; Reidy, J.A.; Needham, L.L. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-Tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116*, 39–44. [CrossRef]
51. Grant, K.L. Sample Organization Environmental Contributions to Obesity and Type 2 Diabetes. *J. Environmental Immunol. Toxicol.* **2013**, *1*, 80. [CrossRef]
52. Darbre, P.D. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr. Obes. Rep.* **2017**, *6*, 18–27. [CrossRef] [PubMed]
53. Legeay, S.; Faure, S. Is Bisphenol A an Environmental Obesogen? *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2017**, *31*, 594–609. [CrossRef] [PubMed]
54. Wu, W.; Li, M.; Liu, A.; Wu, C.; Li, D.; Deng, Q.; Zhang, B.; Du, J.; Gao, X.; Hong, Y. Bisphenol A and the Risk of Obesity: A Systematic Review With Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence. *Dose-Response* **2020**, *18*, 155932582091694. [CrossRef] [PubMed]
55. Wang, Y.; Rui, M.; Nie, Y.; Lu, G. Influence of Gastrointestinal Tract on Metabolism of Bisphenol A as Determined by in Vitro Simulated System. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *355*, 111–118. [CrossRef] [PubMed]
56. Jacobson, M.H.; Woodward, M.; Bao, W.; Liu, B.; Trasande, L. Urinary Bisphenols and Obesity Prevalence Among U.S. Children and Adolescents. *J. Endocr. Soc.* **2019**, *3*, 1715–1726. [CrossRef] [PubMed]
57. Marques, V.B.; Faria, R.A.; Santos, L.D. Overview of the Pathophysiological Implications of Organotins on the Endocrine System. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 101. [CrossRef] [PubMed]
58. Grün, F. Obesogens. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2010**, *17*, 453–459. [CrossRef]
59. Hoch, M. Organotin Compounds in the Environment—An Overview. *Appl. Geochem.* **2001**, *16*, 719–743. [CrossRef]
60. Gadd, G.M. Microbial Interactions with Tributyltin Compounds: Detoxification, Accumulation, and Environmental Fate. *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 119–127. [CrossRef]
61. Chamorro-García, R.; Blumberg, B. Transgenerational Effects of Obesogens and the Obesity Epidemic. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *19*, 153–158. [CrossRef]

62. Rantakokko, M.; Iwarsson, S.; Portegijs, E.; Viljanen, A.; Rantanen, T. Associations Between Environmental Characteristics and Life-Space Mobility in Community-Dwelling Older People. *J. Aging Health* **2015**, *27*, 606–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Okoro, H.K.; Fatoki, O.S.; Adekola, F.A.; Ximba, B.J.; Snyman, R.G.; Opeolu, B. Human Exposure, Biomarkers, and Fate of Organotins in the Environment. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Whitacre, D.M., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2011; Volume 213, pp. 27–54. ISBN 978-1-4419-9859-0.
64. Kannan, K.; Takahashi, S.; Fujiwara, N.; Mizukawa, H.; Tanabe, S. Organotin Compounds, Including Butyltins and Octyltins, in House Dust from Albany, New York, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *58*, 901–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, Z.; Yu, Z.; Gao, P.; Yin, D. Multigenerational Effects of Perfluorooctanoic Acid on Lipid Metabolism of *Caenorhabditis Elegans* and Its Potential Mechanism. *Sci. Total Environ.* **2020**, *703*, 134762. [[CrossRef](#)]
66. Bloom, M.S.; Commodore, S.; Ferguson, P.L.; Neelon, B.; Pearce, J.L.; Baumer, A.; Newman, R.B.; Grobman, W.; Tita, A.; Roberts, J.; et al. Association between Gestational PFAS Exposure and Children's Adiposity in a Diverse Population. *Environ. Res.* **2022**, *203*, 111820. [[CrossRef](#)]
67. Giuliani, A.; Zuccarini, M.; Cichelli, A.; Khan, H.; Reale, M. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 5655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Stahlhut, R.W.; Wijngaarden, E.V.; Dye, T.D.; Cook, S.; Swan, S.H. Concentrations of Urinary Phthalate Metabolites Are Associated with Increased Waist Circumference and Insulin Resistance in Adult U.S. Males. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 876–882. [[CrossRef](#)]
69. Hao, C.; Cheng, X.; Xia, H.; Ma, X. The Endocrine Disruptor Mono-(2-Ethylhexyl)Phthalate Promotes Adipocyte Differentiation and Induces Obesity in Mice. *Biosci. Rep.* **2012**, *32*, 619–629. [[CrossRef](#)]
70. Berman, Y.E.; Doherty, D.A.; Main, K.M.; Frederiksen, H.; Keelan, J.A.; Newnham, J.P.; Hart, R.J. The Influence of Prenatal Exposure to Phthalates on Subsequent Male Growth and Body Composition in Adolescence. *Environ. Res.* **2021**, *195*, 110313. [[CrossRef](#)]
71. Pallotti, F.; Pelloni, M.; Gianfrilli, D.; Lenzi, A.; Lombardo, F.; Paoli, D. Mechanisms of Testicular Disruption from Exposure to Bisphenol A and Phthalates. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 471. [[CrossRef](#)]
72. Mezcua, M.; Martínez-Uroz, M.A.; Gómez-Ramos, M.M.; Gómez, M.J.; Navas, J.M.; Fernández-Alba, A.R. Analysis of Synthetic Endocrine-Disrupting Chemicals in Food: A Review. *Talanta* **2012**, *100*, 90–106. [[CrossRef](#)]
73. Guo, W.; Holden, A.; Smith, S.C.; Gephart, R.; Petreas, M.; Park, J.-S. PBDE Levels in Breast Milk Are Decreasing in California. *Chemosphere* **2016**, *150*, 505–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wong, K.H.; Durrani, T.S. Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals in Consumer Products—A Guide for Pediatricians. *Curr. Probl. Pediatric Adolesc. Health Care* **2017**, *47*, 107–118. [[CrossRef](#)]
75. Vuong, A.M.; Braun, J.M.; Wang, Z.; Yorton, K.; Xie, C.; Sjodin, A.; Webster, G.M.; Lanphear, B.P.; Chen, A. Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) during Childhood and Adiposity Measures at Age 8 Years. *Environ. Int.* **2019**, *123*, 148–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wen, Q.; Xie, X.; Ren, Q.; Du, Y. Polybrominated Diphenyl Ether Congener 99 (PBDE 99) Promotes Adipocyte Lineage Commitment of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells. *Chemosphere* **2022**, *290*, 133312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Tung, E.W.Y.; Boudreau, A.; Wade, M.G.; Atlas, E. Induction of Adipocyte Differentiation by Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in 3T3-L1 Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94583. [[CrossRef](#)]
78. Lv, Q.-X.; Wang, W.; Li, X.-H.; Yu, L.; Zhang, Y.; Tian, Y. Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyl Ethers in Adipose Tissue and Matched Serum from an E-Waste Recycling Area (Wenling, China). *Environ. Pollut.* **2015**, *199*, 219–226. [[CrossRef](#)]
79. Martí-Cid, R.; Llobet, J.M.; Castell, V.; Domingo, J.L. Human Exposure to Polychlorinated Naphthalenes and Polychlorinated Diphenyl Ethers from Foods in Catalonia, Spain: Temporal Trend. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4195–4201. [[CrossRef](#)]
80. Brown, R.H.; Ng, D.K.; Steele, K.; Schweitzer, M.; Groopman, J.D. Mobilization of Environmental Toxicants Following Bariatric Surgery. *Obesity* **2019**, *27*, 1865–1873. [[CrossRef](#)]
81. Valvi, D.; Mendez, M.A.; Martínez, D.; Grimalt, J.O.; Torrent, M.; Sunyer, J.; Vrijheid, M. Prenatal Concentrations of Polychlorinated Biphenyls, DDE, and DDT and Overweight in Children: A Prospective Birth Cohort Study. *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 451–457. [[CrossRef](#)]
82. Tang-Péronard, J.L.; Heitmann, B.L.; Andersen, H.R.; Steuerwald, U.; Grandjean, P.; Weihe, P.; Jensen, T.K. Association between Prenatal Polychlorinated Biphenyl Exposure and Obesity Development at Ages 5 and 7 y: A Prospective Cohort Study of 656 Children from the Faroe Islands. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 5–13. [[CrossRef](#)]
83. Bhatta, M.; Verma, M.; Kathuria, D. Recent Advancements in the Detection of Organophosphate Pesticides: A Review. *Anal. Methods* **2021**, *13*, 4390–4428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Suratman, S.; Edwards, J.W.; Babina, K. Organophosphate Pesticides Exposure among Farmworkers: Pathways and Risk of Adverse Health Effects. *Rev. Environ. Health* **2015**, *30*, 65–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Blanco, J.; Guardia-Escote, L.; Mulero, M.; Basaure, P.; Biosca-Brull, J.; Cabré, M.; Colomina, M.T.; Domingo, J.L.; Sánchez, D.J. Obesogenic Effects of Chlorpyrifos and Its Metabolites during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *137*, 111171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Silva, M.H. Chlorpyrifos and Δ^9 Tetrahydrocannabinol Exposure and Effects on Parameters Associated with the Endocannabinoid System and Risk Factors for Obesity. *Curr. Res. Toxicol.* **2021**, *2*, 296–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Aggarwal, V.; Deng, X.; Tuli, A.; Goh, K.S. Diazinon—Chemistry and Environmental Fate: A California Perspective. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Whitacre, D.M., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2013; Volume 223, pp. 107–140. ISBN 978-1-4614-5576-9.
88. Smith, A.; Yu, X.; Yin, L. Diazinon Exposure Activated Transcriptional Factors CCAAT-Enhancer-Binding Proteins α (C/EBP α) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) and Induced Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *150*, 48–58. [CrossRef] [PubMed]
89. Cano-Sancho, G.; Salmon, A.G.; Merrill, M.A.L. Association between Exposure to *p,p'*-DDT and Its Metabolite *p,p'*-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 096002. [CrossRef] [PubMed]
90. Lee, D.-H.; Porta, M.; Jacobs, D.R.; Vandenberg, L.N. Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* **2014**, *35*, 557–601. [CrossRef]
91. Lee, H.K. Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance: The Contribution of Dioxin-Like Substances. *Diabetes Metab. J.* **2011**, *35*, 207–215. [CrossRef]
92. Kladrnicka, I.; Cedikova, M.; Jedlicka, J.; Kohoutova, M.; Muller, L.; Plavinova, I.; Kripnerova, M.; Bludovska, M.; Kuncova, J.; Mullerova, D. Chronic DDE Exposure Modifies Mitochondrial Respiration during Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Adipocytes. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1068. [CrossRef]
93. Ghosh, N.; Roy, S.; Mondal, J.A. On the Behavior of Perfluorinated Persistent Organic Pollutants (POPs) at Environmentally Relevant Aqueous Interfaces: An Interplay of Hydrophobicity and Hydrogen Bonding. *Langmuir* **2020**, *36*, 3720–3729. [CrossRef]
94. Elmore, S.E.; Merrill, M.A.L. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 122. [CrossRef] [PubMed]
95. Juan, P. Arrebola y Beatriz González Alzaga—Exposición a contaminantes ambientales por vía alimentaria y repercusiones metabólicas. *Nutrición Clínica En Medicina* **2016**, *10*, 164–174. [CrossRef]
96. Podechard, N.; Fardel, O.; Corolleur, M.; Bernard, M.; Lecœur, V. Inhibition of Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Adipogenesis by the Environmental Contaminant Benzo(a)Pyrene. *Toxicol. Vitro* **2009**, *23*, 1139–1144. [CrossRef] [PubMed]
97. González-Casanova, J.E.; Pertuz-Cruz, S.L.; Caicedo-Ortega, N.H.; Rojas-Gomez, D.M. Adipogenesis Regulation and Endocrine Disruptors: Emerging Insights in Obesity. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 7453786. [CrossRef] [PubMed]
98. Han, M.; Wang, Y.; Tang, C.; Fang, H.; Yang, D.; Wu, J.; Wang, H.; Chen, Y.; Jiang, Q. Association of Triclosan and Triclocarban in Urine with Obesity Risk in Chinese School Children. *Environ. Int.* **2021**, *157*, 106846. [CrossRef]
99. Ha, N.-Y.; Kim, D.H.; Ryu, J.Y. Relationship between Triclosan Exposure and Thyroid Hormones: The Second Korean National Environmental Health Survey (2012–2014). *Ann. Occup. Environ. Med.* **2019**, *31*, e22. [CrossRef]
100. He, M.; Zeng, X.; Zhang, K.; Kinney, P. Fine Particulate Matter Concentrations in Urban Chinese Cities, 2005–2016: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 191. [CrossRef]
101. Mukherjee, A.; Agrawal, M. A Global Perspective of Fine Particulate Matter Pollution and Its Health Effects. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; de Voogt, P., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; Volume 244, pp. 5–51. ISBN 978-3-319-66874-1.
102. Bowe, B.; Gibson, A.K.; Xie, Y.; Yan, Y.; Donkelaar, A.V.; Martin, R.V.; Al-Aly, Z. Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Risk of Weight Gain and Obesity in United States Veterans: An Observational Cohort Study. *Environ. Health Perspect.* **2021**, *129*, 047003. [CrossRef]
103. Matsuyama, S.; Oki, Y.; Yokoki, Y. Obesity Induced by Monosodium Glutamate in Mice. *Natl. Inst. Anim. Health. Q* **1973**, *13*, 91–101.
104. Sun, Z.; Yang, X.; Liu, Q.S.; Li, C.; Zhou, Q.; Fiedler, H.; Liao, C.; Zhang, J.; Jiang, G. Butylated Hydroxyanisole Isomers Induce Distinct Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *379*, 120794. [CrossRef]
105. Sun, Z.; Tang, Z.; Yang, X.; Liu, Q.S.; Liang, Y.; Fiedler, H.; Zhang, J.; Zhou, Q.; Jiang, G. Perturbation of 3-Tert-Butyl-4-Hydroxyanisole in Adipogenesis of Male Mice with Normal and High Fat Diets. *Sci. Total Environ.* **2020**, *703*, 135608. [CrossRef] [PubMed]
106. Shannon, M.; Green, B.; Willars, G.; Wilson, J.; Matthews, N.; Lamb, J.; Gillespie, A.; Connolly, L. The Endocrine Disrupting Potential of Monosodium Glutamate (MSG) on Secretion of the Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Gut Hormone and GLP-1 Receptor Interaction. *Toxicol. Lett.* **2017**, *265*, 97–105. [CrossRef] [PubMed]
107. Shannon, M.; Wilson, J.; Xie, Y.; Connolly, L. In Vitro Bioassay Investigations of Suspected Obesogen Monosodium Glutamate at the Level of Nuclear Receptor Binding and Steroidogenesis. *Toxicol. Lett.* **2019**, *301*, 11–16. [CrossRef] [PubMed]
108. Matysková, R.; Maletínská, L.; Maixnerová, J.; Pírník, Z.; Kiss, A.; Zelezná, B. 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. *Physiol. Res.* **2008**, *57*, 727–734. [CrossRef] [PubMed]
109. Maletínská, L.; Toma, R.S.; Pírník, Z.; Kiss, A.; Slaninová, J.; Haluzík, M.; Zelezná, B. Effect of Cholecystokinin on Feeding Is Attenuated in Monosodium Glutamate Obese Mice. *Regul. Pept.* **2006**, *136*, 58–63. [CrossRef] [PubMed]
110. Bhattacharyya, S.; O'Sullivan, L.; Katyal, S.; Unterman, T.; Tobacman, J.K. Exposure to the Common Food Additive Carrageenan Leads to Glucose Intolerance, Insulin Resistance and Inhibition of Insulin Signalling in HepG2 Cells and C57BL/6j Mice. *Diabetologia* **2012**, *55*, 194–203. [CrossRef]
111. Zhang, H.; Cao, W.; Liu, F.; Gao, Y.; Chang, Y.; Xue, C.; Tang, Q. The Mechanism Exploration of the Non-colonic Toxicity and Obesity Inhibition of Food-grade K-carrageenan by Transcriptome. *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 6232–6244. [CrossRef]

112. Mangge, H.; Ciardi, C.; Becker, K.; Strasser, B.; Fuchs, D.; Gostner, J.M. Influence of Antioxidants on Leptin Metabolism and Its Role in the Pathogenesis of Obesity. In *Obesity and Lipotoxicity*; Engin, A.B., Engin, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 399–413. ISBN 978-3-319-48380-1.
113. Mangge, H.; Summers, K.; Almer, G.; Prassl, R.; Weghuber, D.; Schnedl, W.; Fuchs, D. Antioxidant Food Supplements and Obesity-Related Inflammation. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2330–2337. [[CrossRef](#)]
114. Shao, W.; Xu, J.; Xu, C.; Weng, Z.; Liu, Q.; Zhang, X.; Liang, J.; Li, W.; Zhang, Y.; Jiang, Z.; et al. Early-Life Perfluorooctanoic Acid Exposure Induces Obesity in Male Offspring and the Intervention Role of Chlorogenic Acid. *Environ. Pollut.* **2021**, *272*, 115974. [[CrossRef](#)]
115. Zhang, L.; Sun, W.; Duan, X.; Duan, Y.; Sun, H. Promoting Differentiation and Lipid Metabolism Are the Primary Effects for DINP Exposure on 3T3-L1 Preadipocytes. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113154. [[CrossRef](#)]
116. Hoppe, A.A.; Carey, G.B. Polybrominated Diphenyl Ethers as Endocrine Disruptors of Adipocyte Metabolism. *Obesity* **2007**, *15*, 2942–2950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Helaleh, M.; Diboun, I.; Al-Tamimi, N.; Al-Sulaiti, H.; Al-Emadi, M.; Madani, A.; Mazloum, N.A.; Latiff, A.; Elrayess, M.A. Association of Polybrominated Diphenyl Ethers in Two Fat Compartments with Increased Risk of Insulin Resistance in Obese Individuals. *Chemosphere* **2018**, *209*, 268–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Jackson, E.; Shoemaker, R.; Larian, N.; Cassis, L. Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Compr. Physiol.* **2017**, *7*, 1085–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Ge, Y.; Gu, P.; Wang, W.; Cao, L.; Zhang, L.; Li, J.; Mu, W.; Wang, H. Benzo[a]Pyrene Stimulates MiR-650 Expression to Promote the Pathogenesis of Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma via SOCS3/JAK/STAT3 Cascades. *J. Mol. Cell Biol.* **2021**, *13*, 556–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Allard, J.; Guillou, D.L.; Begriche, K.; Fromenty, B. Drug-Induced Liver Injury in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Advances in Pharmacology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 75–107. ISBN 978-0-12-816759-5.
121. Qiao, L.; Chu, K.; Watzel, J.-S.; Lee, S.; Gao, H.; Feng, G.-S.; Hay, W.W.; Shao, J. High-Fat Feeding Reprograms Maternal Energy Metabolism and Induces Long-Term Postpartum Obesity in Mice. *Int. J. Obes.* **2019**, *43*, 1747–1758. [[CrossRef](#)]
122. Li, X.; Pham, H.T.; Janesick, A.S.; Blumberg, B. Triflumizole Is an Obesogen in Mice That Acts through Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR γ). *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 1720–1726. [[CrossRef](#)]
123. Regnier, S.M.; Kirkley, A.G.; Ye, H.; El-Hashani, E.; Zhang, X.; Nee, B.A.; Kamau, W.; Thomas, C.C.; Williams, A.K.; Hayes, E.T.; et al. Dietary Exposure to the Endocrine Disruptor Tolyfluanid Promotes Global Metabolic Dysfunction in Male Mice. *Endocrinology* **2015**, *156*, 896–910. [[CrossRef](#)]
124. Benbrook, C.M. Impacts of Genetically Engineered Crops on Pesticide Use in the U.S.—The First Sixteen Years. *Environ. Sci. Eur.* **2012**, *24*, 24. [[CrossRef](#)]
125. Rezaei, E.; Nejati, R.; Sayadi, M.; Nematollahi, A. Diazinon Reduction in Apple Juice Using Probiotic Bacteria during Fermentation and Storage under Refrigeration. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 61213–61224. [[CrossRef](#)]

Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue

I. KLADNICKÁ^{1,2}, M. ČEDÍKOVÁ^{3,4}, M. KRIPNEROVÁ⁵, J. DVOŘÁKOVÁ⁶,
M. KOHOUTOVÁ^{3,4}, Z. TŮMA⁴, D. MÜLLEROVÁ^{1,2}, J. KUNCOVÁ^{3,4}



Article

Chronic DDE Exposure Modifies Mitochondrial Respiration during Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Adipocytes

Iva Kladnická^{1,2,*}, Miroslava Cedikova^{3,4}, Jan Jedlicka³, Michaela Kohoutova^{3,4}, Ludek Muller²,
Iveta Plavinova¹, Michaela Kripnerova⁵, Monika Bludovska^{1,2,6}, Jitka Kuncova^{3,4,†} and Dana Mullerova^{1,2,†}

- ¹ Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic; Iveta.Plavinova@fp.cuni.cz (I.P.); Monika.Bludovska@fp.cuni.cz (M.B.); Dana.Mullerova@fp.cuni.cz (D.M.)
 - ² NTIS, European Center of Excellence New Technologies for the Information Society, University of West Bohemia, 301 00 Pilsen, Czech Republic; muller@kkyz.cu.cz
 - ³ Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic; Miroslava.Cedikova@fp.cuni.cz (M.C.); Jan.Jedlicka@fp.cuni.cz (J.J.); Michaela.Kohoutova@fp.cuni.cz (M.K.); Jitka.Kuncova@fp.cuni.cz (J.K.)
 - ⁴ Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic
 - ⁵ Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic; Michaela.Kripnerova@fp.cuni.cz
 - ⁶ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 301 00 Pilsen, Czech Republic
- * Correspondence: Iva.Kladnicka@fp.cuni.cz; Tel.: +420-377-593-193
† Joint senior authorship.



Citation: Kladnická, I.; Čedíková, M.; Jedlická, J.; Kohoutová, M.; Mulket, L.; Plavinová, I.; Kripnerová, M.; Bludovská, M.; Kuncová, J.; Müllerová, D. Chronic DDE Exposure Modifies Mitochondrial Respiration during Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Adipocytes. *Biomolecules* 2021, 11, 1068. <https://doi.org/10.3390/biom11081068>

Academic Editors: Dariusz Widana, Wee Kiat Ong and Jonathan Sheard

Received: 15 May 2021
Accepted: 20 July 2021
Published: 21 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The contribution of environmental pollutants to the obesity pandemic is still not yet fully recognized. Elucidating possible cellular and molecular mechanisms of their effects is of high importance. Our study aimed to evaluate the effect of chronic, 21-day-long, 2,2-bis (4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylenedichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) exposure of human adipose-derived mesenchymal stem cells committed to adipogenesis on mitochondrial oxygen consumption on days 4, 10, and 21. In addition, the mitochondrial membrane potential (MMP), the quality of the mitochondrial network, and lipid accumulation in maturing cells were evaluated. Compared to control differentiating adipocytes, exposure to p,p'-DDE at 1 µM concentration significantly increased basal (routine) mitochondrial respiration, ATP-linked oxygen consumption and MMP of intact cells on day 21 of adipogenesis. In contrast, higher pollutant concentration seemed to slow down the gradual increase in ATP-linked oxygen consumption typical for normal adipogenesis. Organochlorine p,p'-DDE did not alter citrate synthase activity. In conclusion, in vitro 1 µM p,p'-DDE corresponding to human exposure is able to increase the mitochondrial respiration per individual mitochondrion at the end of adipocyte maturation. Our data reveal that long-lasting exposure to p,p'-DDE could interfere with the metabolic programming of mature adipocytes.

Keywords: human adipose-derived mesenchymal stem cells; adipogenesis; p,p'-DDE; mitochondrial respiration

1. Introduction

Adipose tissue is a complex heterogeneous and highly dynamic organ performing many functions. It contributes to the control of energy metabolism of the whole organism. The specific function of adipose tissue is to provide mature adipocytes, i.e., cells that are able to store energy in lipid droplets in the form of triglycerides and release it in the chemical or thermal form according to the body requirements [1]. Adipogenesis, the process during which the mature adipocytes differentiate from their precursors, mesenchymal stem cells, is necessary for the dynamic renewal and optimal function of adipose tissue. It is supposed

that the increase in adipocyte number is triggered by signaling factors that induce the commitment of pluripotent mesenchymal stem cells residing in the vascular stroma to the adipocyte lineage. When committed, preadipocytes are subjected to mitotic clonal expansion undergoing two or three cell divisions and then they gradually acquire typical adipocyte metabolic and morphological characteristic in the process of differentiation [2]. In the course of adipogenesis, mitochondrial oxygen consumption progressively increases. During the first days of adipogenesis, mitochondrial oxygen consumption is needed for the transition of differentiating cells from glycolytic to oxidative metabolism and the clonal expansion of preadipocytes, and then more energy is needed to acquire the typical metabolic phenotype of mature adipocyte [3].

Mature adipocytes make up only 20–30% of the total number of cells in adipose tissue. The remaining cells are made up of stromal vascular fraction and belong to the immune, epithelial, vascular, and stromal cells [4]. Besides storage and distribution of energy, adipose tissue contributes to the regulation of systemic energy metabolism by means of adipokines secretion such as adiponectin, leptin, resistin, interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α . The secretion of adipokines enables autocrine, paracrine, endocrine, and cross talk communication with other organs [5]. Physiological production of adipokines requires intact cellular machinery of mature adipocyte, in particular mitochondrial respiration and balance between lipogenesis and lipolysis. Dysfunctional secretion of adipokines and free fatty acids induces an inflammatory response that is supposed to be the basis of peripheral insulin resistance [6]. These processes are linked to the specific distribution and accumulation of visceral fat, its morphological and inflammatory restructure, which are the main causes of metabolic complications, like diabetes mellitus type 2 and increased cardiovascular risk, even in a population with a normal body weight [7,8].

According to the last definition of the European Commission, obesity is depicted as a chronic relapsing disease, which in turn acts as a gateway to a range of other non-communicable diseases, such as diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. Over the last forty years, the prevalence of obesity is increasing worldwide, achieving pandemic levels [9]. Many epidemiological and experimental studies suggest that obesity and associated dysfunction of adipose tissue might be a consequence of several interconnected causes such as genetic, environmental, and social factors [10,11].

The obesogenic environment is crucial in this trend. One of the possible characteristics of the obesogenic environment is chronic exposure to environmental contaminants, especially organochlorines, like pesticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl]ethane (DDT) [12]. It has been documented that DDT and its metabolite 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylenedichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) are associated with the increased risk of obesity and type 2 diabetes mellitus, and therefore they are called “metabolic disruptors” or “obesogens” [13–16]. Although production of DDT was banned in the late 1970s, its metabolites, especially *p,p'*-DDE can still be detected in human serum and samples rich in fat, such as breast milk [17,18].

DDE is accumulated and stored in lipophilic tissues, especially in adipose tissue. The variability of the stored amount of DDE in adipose tissue can range over several orders of magnitude, depends on dietary exposure and on individual disposition to store these substances [19,20]. For example, in the Smeds and Saukko study, DDE concentration levels in human adipose tissue ranged from 3.5 to 3229 ng/g lipids [13]. That serum concentration levels in men may exceed 3000 ng/g lipids was also confirmed [14]. These high values of serum concentration, based on lipid weight conversion correspond to 0.1 μ M DDE. Concentration in the adipose tissue could be even one order higher.

The obesogenic action of these compounds disrupts homeostatic control over energy balance leading to overabundance in the metabolic pathways involved in energy storage over those that are responsible for metabolic energy expenditure flow [21]. Increasing evidence suggests that mitochondria might be a key player in the development of obesity. Multiple experimental studies demonstrated the inhibitory effects of organochlorines on mitochondrial oxygen consumption in the liver, brain, or skeletal muscle [22,23]. The impact

of long-lasting DDE exposure on mitochondrial respiration of differentiating adipocytes has not been studied yet [24].

In our study, we employed human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADM-SCs) committed to adipogenesis. The effects of *p,p'*-DDE in concentrations 1 μM and 10 μM on differentiating adipocyte mitochondrial oxygen consumption, citrate synthase activity, and mitochondrial membrane potential were evaluated on days 4, 10, and 21 of adipogenesis. In addition, lipid accumulation and mitochondrial quality were assessed to verify the phenotype of differentiating cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture and Differentiation In Vitro

Human adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated from a female donors' subcutaneous adipose tissue, purchased from Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and cultivated. The cells were seeded at 1×10^5 cells/cm² and cultured in Petri dishes (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in commercially available culture medium MesenPRO RS™. The medium was supplemented with MesenPRO RS™ Growth Supplement with reduced serum level (2%), 1% L-glutamine, and 1% gentamicin (all Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

After reaching 80% confluence, the culture medium was changed to four different differentiation media: (A) pure differentiation medium (DM); (B) differentiation medium with dimethyl sulfoxide (DMSO); (C) differentiation medium with DMSO and *p,p'*-DDE, in final concentration 1 μM (DDE 1 μM); (D) differentiation medium with DMSO and *p,p'*-DDE in final concentration 10 μM (DDE 10 μM). The pure differentiation medium contained StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal Medium with StemPro® Adipogenesis Supplement and 1% gentamicin (all Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). DDE concentrations 1 μM and 10 μM were chosen because of their most common use in *in vitro* studies. DMSO, which is commonly used as a solvent of lipophilic compounds for *in vitro* cell experiments, is generally considered nontoxic up to 0.05% concentration (*v/v*) [18]; however, some studies suggest that this solvent can even promote proliferation at least in some cell lines [25]. On that account, we first compared the differentiation process under DM alone with the differentiation medium with DMSO in concentration used in our experiments, i.e., 0.019%. We have found that the addition of DMSO affected the process of differentiation, since the cell count per well measured using NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) as described below displayed a slightly different pattern in the course of adipogenesis. Thus, all our results acquired from DDE-exposed cell cultures were compared separately to the cells differentiating in the same medium with or without DMSO. A summary scheme of the experiment is shown in Figure 1.

The medium was changed every 3 days up to a total incubation time of 21 days. The cells were maintained and cultured into differentiated adipocytes under 5% CO₂ atmosphere at 37 °C [26]. The independent experimental number for each method was 12 except in high-resolution respirometry. With the aim to prove that the experimental system was running as expected, we monitored the process of adipogenesis by Oil Red O staining and fluorescent probe staining methods.

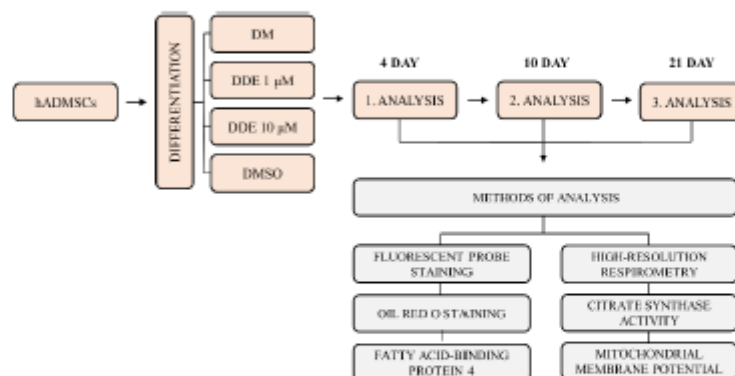


Figure 1. Summary scheme of the experiment. DM: pure differentiation medium; DDE 1 μ M: differentiation medium with added *p,p'*-DDE, which was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO); DDE 10 μ M: differentiation medium with added *p,p'*-DDE, which was dissolved in DMSO; DMSO: differentiation medium (DM) with DMSO only.

2.2. High-Resolution Respirometry

Mitochondrial respiration of intact adipocytes on days 4 ($n = 6$ per group; i.e., DM, DMSO, DDE 1 μ M, DDE 10 μ M), 10 ($n = 6$) and 21 ($n = 6$) of differentiation was analyzed in the StemPro[®] Adipogenesis Differentiation medium using high-resolution respirometry in a 2-chamber oxygraph O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). The negative time derivative of the oxygen concentration in the chamber was calculated online to determine oxygen consumption (DatLab software, version 7.3.0.3, Oroboros, Austria). The cells were applied into the open precalibrated oxygraph chambers, stirred at 350 rpm and a sample of 15 μ L of the cell suspension was aspirated to count the cells in the Bürker hemocytometer. After closing the oxygraph chambers, a substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocol for intact cells was used to determine the standard respiratory states: ROUTINE (ROUT; R)—oxygen consumption at the physiological coupled state; LEAK (L; injection of 2.5 μ mol/L oligomycin)—non-phosphorylating resting state of respiration to compensate for the proton leak when ATP synthase is not active; the electron-transfer-system capacity (ETSC; E) was assessed after titrations of trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP; 0.05 μ mol/L titration steps) to reach maximal oxygen consumption in the noncoupled state; and ROX, residual oxygen consumption indicating oxidative side reactions remaining after inhibition of the electron transfer pathway (0.5 μ mol/L rotenone and 2.5 μ mol/L antimycin A) [21]. Oxygen consumption was expressed in $\text{pmol O}_2 / (\text{s} \cdot 10^6 \text{ cells})$ and corrected to ROX and instrumental background. The representative scheme of the experiment on intact cells is shown in Figure 2.

In addition, the following control parameters were calculated: L/E coupling control ratio as an index of uncoupling; R/E control ratio showing how close ROUT operates to ETSC; E-R reserve capacity reflecting the difference between noncoupled and coupled respiration; R-L or net routine capacity related to the cellular ATP production.

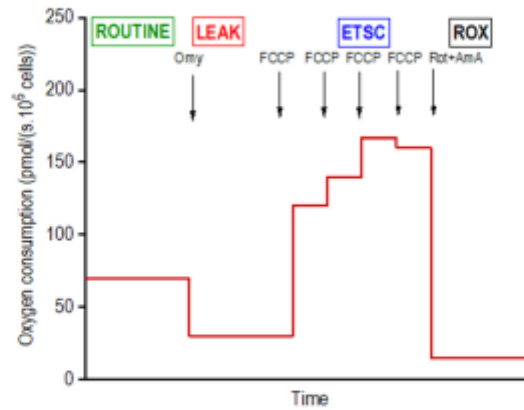


Figure 2. Design of a titration protocol for measuring the mitochondrial oxygen consumption in intact differentiating adipocytes. For the concentrations of inhibitors and uncoupler utilized and definition of respiratory states, see Methods.

2.3. Citrate Synthase Activity

The determination of citrate synthase activity was used to estimate mitochondrial content in the samples from each oxygraph chamber. The assay medium for citrate synthase activity consisted of 0.1 mmol/L 5,5-dithio-bis- (2-nitrobenzoic) acid, 0.25% triton-X, 0.5 mmol/L oxaloacetate, 0.31 mmol/L acetyl coenzyme A, 5 μ mol/L EDTA, 5 mmol/L triethanolamine hydrochloride, and 0.1 mol/L tris-HCl, pH 8.1. One hundred microliters of the mixed and homogenized chamber content were added to 900 μ L of the medium. The rate of absorbance change was measured spectrophotometrically at 412 nm and 30 $^{\circ}$ C over 200 s.

2.4. Mitochondrial Membrane Potential

The mitochondrial membrane potential (MMP) was measured using the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Mitosciences, Abcam, Cambridge, UK). The cells were seeded at 1×10^4 cells on a dark 96-well plate and cultured as explained earlier. The MMP was evaluated on days 4 ($n = 12$), 10 ($n = 12$), and 21 ($n = 12$) of differentiation. The cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with JC-1 dye (1 μ M) at 37 $^{\circ}$ C for 10 min. Then the cells were rinsed twice with PBS and were analyzed on a fluorescence spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA) at excitation 475 nm and emission 530/590 nm. The red/green fluorescence intensity ratio was determined to evaluate MMP.

2.5. Oil Red O, Fluorescent Probe Staining, and Fatty Acid-Binding Protein 4

All these methods have been used to prove that the experimental system was performing as expected.

2.5.1. Oil Red O Staining

Oil Red O is a fat-soluble dye that stains neutral triglycerides and lipids [27]. Intracellular triglyceride droplets of hADMSCs were stained with Oil Red O solution on day 4, 10, and 21. The sample preparation procedure was as follows: medium was removed, each well was rinsed twice in PBS, and fixed in 4% formaldehyde for 1 h at room temperature. The cells were then rinsed twice with distilled water and stained with Oil Red O solution (0.5 g of Oil Red O powder dissolved in 100 mL of isopropanol). This solution was blended with distilled water in the ratio 3:2. Cells were incubated with this solution for 15 min

at room temperature, then washed twice with distilled water and visualized using the Olympus CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) connected to a digital camera.

Figure 3 shows the intracellular fat droplets during differentiation in all four types of the media.

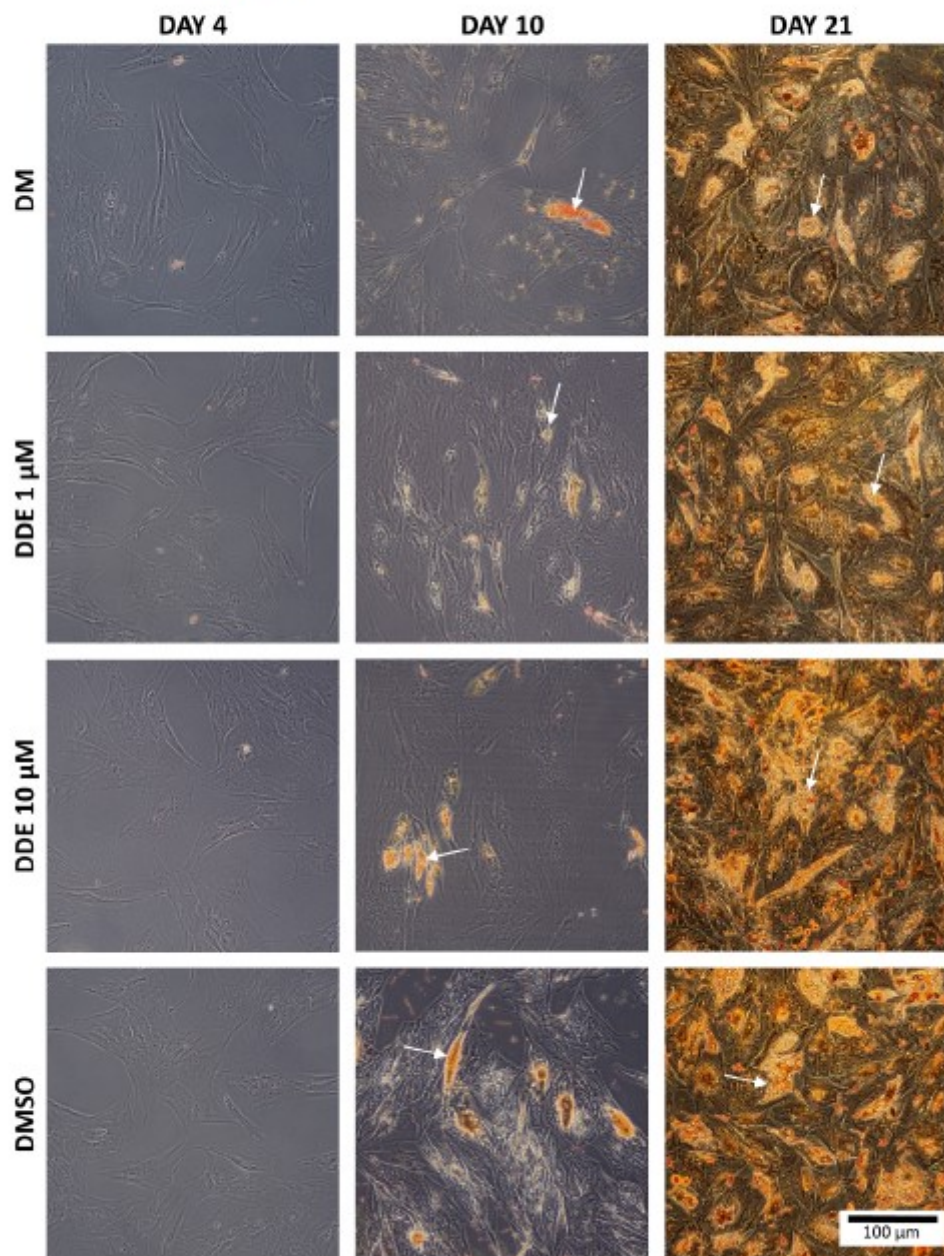


Figure 3. The comparison of fat in each environment. The arrows show examples of fat droplets. (Oil Red O staining).

2.5.2. Fluorescent Probe Staining

Fluorescent probes, MitoTracker™ Red CMXRos and NucBlue™ Live ReadyProbes Reagent (both Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were used to visualize the mitochondria and nuclei of cells. MitoTracker™ passively passes into mitochondria and accumulates there. NucBlue™ Reagent contains Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) which emits a blue fluorescence when bound to DNA (Figure 4).

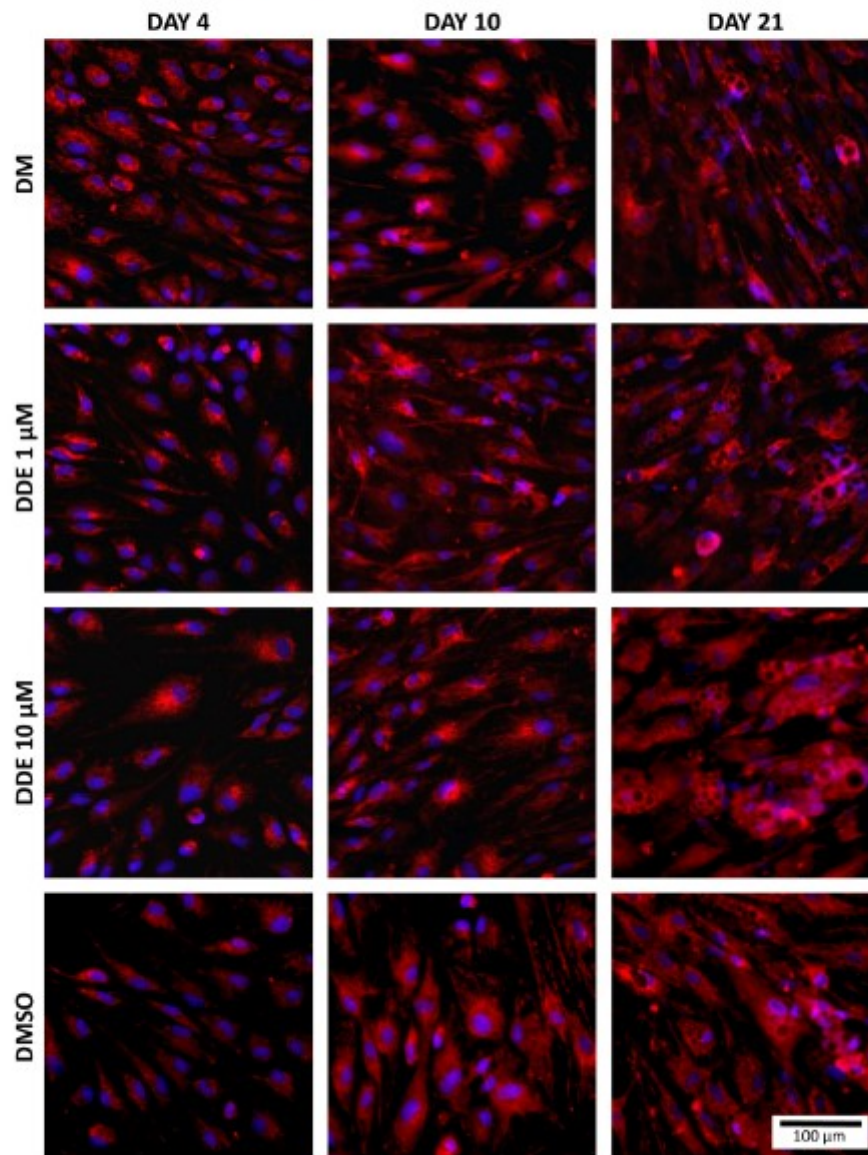


Figure 4. Staining of mitochondria (red) and nuclei (blue) in each environment (fluorescent probes, MitoTracker™ Red CMXRos and NucBlue™ Live ReadyProbes Reagent were used to visualize the mitochondria and nucleus of cells).

The cells were first stripped of differentiation medium, which was replaced with special medium for live cell imaging—Live Cell Imaging Solution (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Subsequently, Mitotracker™ was added to the medium (final concentration 100 nM) and two drops per millilitre of NucBlue™ were added too. Cells were incubated in the dark for 30 min and then visualized by the Hamamatsu Orca-ER camera mounted on the Olympus IX 81 inverted microscope at 200× magnification (Olympus, Tokyo, Japan).

2.5.3. Fatty Acid-Binding Protein 4

Fatty acid-binding protein (FABP4) is highly expressed in adipocytes and consists of about 1% of all soluble proteins in adipose tissue [28]. On day 21, the adipogenic marker FABP4 was measured to confirm the presence of adipocytes.

Cells were washed in phosphate buffered saline (PBS), fixed for 60 min in 4% formaldehyde with PBS at room temperature, and permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 15 min followed by blocking in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) and 10% normal donkey serum at room temperature for 60 min. After blocking, cells were incubated with anti-mFABP4 antibody (anti-mouse Fatty Acids Binding Protein 4, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) working solution (PBS containing 0.03% Triton X-100, 1% BSA, 10% normal donkey serum and anti-mFABP4 in final concentration 10 µg/mL) overnight at 2–8 °C. After three 5-min rinses in PBS with 1% BSA, cells were incubated for 1 h in NL557-conjugated anti-goat secondary antibody (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) diluted 1:200 in 1% BSA in PBS in the dark for 60 min at room temperature. The coverslips were washed, placed on microscope slides with a mounting medium (ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and visualized using the Hamamatsu Orca-ER camera mounted on the Olympus IX 81 inverted microscope at 200× magnification (Olympus, Tokyo, Japan).

2.6. Data Analysis and Statistics

The data were processed with the use of the statistical software MATLAB Statistics Toolbox (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) and OriginPro 2017 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). After testing for normality of distribution (Shapiro Wilk test), normally distributed data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Non-normally distributed data were processed by log-transformation and then analyzed accordingly. In addition, the differences between groups that required transformation or data that could not reach normal distribution were analyzed using the Wilcoxon rank sum and Friedman statistical tests. p -values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. High-Resolution Respirometry

As expected, in the control samples (DM and DMSO), the routine respiration increased between days 4 and 10 of the experiment by ~30%. However, the differences did not reach statistical significance (Figure 5A). In contrast, routine oxygen consumption observed in DDE 1 µM samples on day 10 of adipogenesis was ~50% higher than on day 4 ($p < 0.0001$) and became significantly different also when compared to DDE 10 µM cells. DDE 10 µM adipocytes did not display any increase in the state ROUT between days 4 and 10 of adipogenesis. In cells differentiating in the control media only (DM and DMSO), routine respiration remained nearly the same on day 21. DDE 10 µM cells had higher routine oxygen consumption on day 21 compared to day 4. In adipocytes differentiating in the presence of 1 µM DDE, routine oxygen consumption further increased on day 21 of the experiment and became significantly different compared to both DMSO and DM controls (Figure 5A). The LEAK state, i.e., oxygen consumption after ATP synthesis inhibition by oligomycin gradually increased from day 4 to 21 in the control (DMSO) and DDE 1 µM samples reaching significant difference between days 4 and 21 of the experiment. In DDE 10 µM adipocytes, the leak respiration was very similar on days 4 and 10 (11.6 ± 2.9 and

10.1 ± 3.2 pmol/s $\cdot 10^6$ cells, respectively) and then increased reaching significant difference between days 10 and 21. No significant difference between the treatments was noted on days 4, 10, or 21 of the experiment (Figure 5B). ETSC did not differ between days 4 and 10 and then tended to decline resulting in a significant difference between the DMSO control and DDE 1 μ M adipocytes on day 21 of the experiment. In addition, the ETSC state of DMSO control cells was significantly lower on day 21 compared to day 10 (Figure 5C).

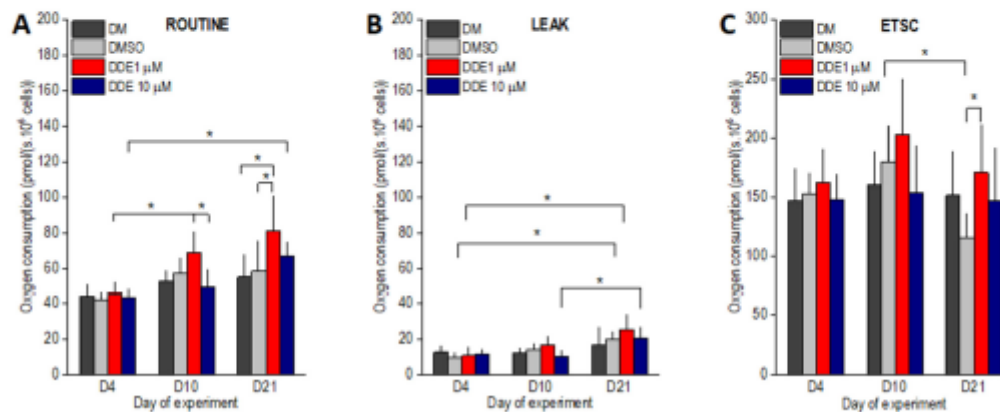


Figure 5. (A–C) ROUTINE, LEAK and uncoupled (ETSC) oxygen consumptions of adipocytes differentiating in media containing no additive (DM) or DMSO, DMSO and 1 μ M p,p'-DDE, and DMSO and 10 μ M p,p'-DDE on days 4, 10, and 21 of the experiment. Significant differences * $p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test).

ATP-linked oxygen consumption, i.e., the R-L state, slightly increased between days 4 and 10 in all groups of differentiating adipocytes and then remained stable. Significant differences between days 4 and 10 of adipogenesis were reached only in DDE 1 μ M and DMSO-control samples. On day 21 of the experiment, R-L was significantly higher in DDE 1 μ M compared to DM and DMSO control groups. Reserve respiratory capacity, i.e., the E-R state, decreased between days 10 and 21; however, this decline was significant only in DMSO adipocytes. The L/E coupling control ratio significantly increased in all DMSO-containing samples on day 21, suggesting that the extent of uncoupling was similar in controls and DDE-treated adipocytes. Similarly, the R/E control ratio increased to a comparable extent in all groups of adipocytes on day 21 of the experiment, documenting that in the later stages of differentiation, routine respiration operates closer to ETSC (Figure 6).

Citrate synthase activity ranged between 10.61 ± 5.26 to 18.32 ± 4.74 mIU/ 10^6 cells in DMSO control cells on day 21 and DDE1 adipocytes on day 10, respectively. No significant difference was noted between individual groups on any day of the experiment nor between adipocytes after the same intervention in the course of the experiment. Data not shown.

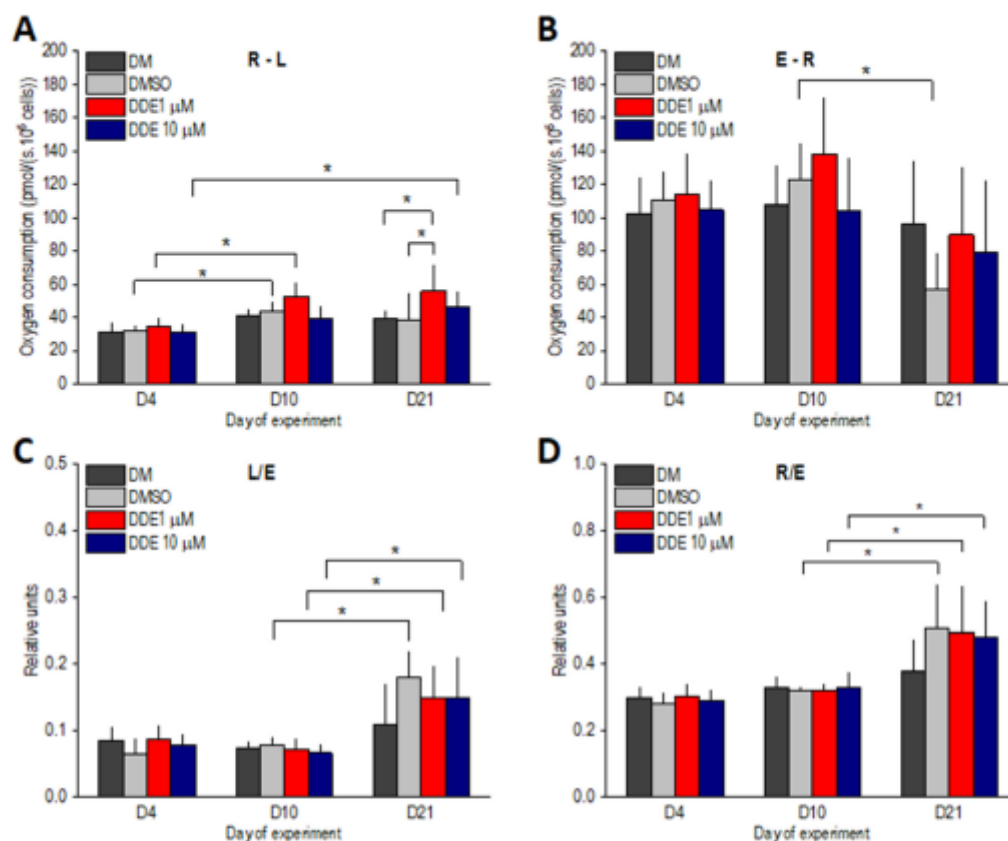


Figure 6. (A,B) ATP-related oxygen consumption (R-L) and reserve ETS capacity (E-R) in adipocytes differentiating in media containing no additive (DM) or DMSO, DMSO and 1 μM *p,p'*-DDE, and DMSO and 10 μM *p,p'*-DDE on days 4, 10, and 21 of the experiment. (C,D) Flux control ratios L/E and R/E. Significant differences * $p < 0.05$ (Friedman and Wilcoxon rank sum tests).

3.2. Mitochondrial Membrane Potential

MMP is one of the key parameters of mitochondrial function and serves as an indicator of cell health—regulation of ATP synthesis, ROS production, calcium sequestration, etc. In healthy cells, JC-1 dye enters the mitochondria and forms red aggregates. Mitochondria in cells with low mitochondrial potential do not form aggregates and remain in monomeric form with green fluorescence. We compared JC1 staining in unaffected adipocyte differentiation and in differentiation under the influence of DMSO and DMSO with DDE. In all cases, we observed a gradual decrease in the red/green ratio during differentiation, which corresponds to previous findings [3,29]. On the fourth day of differentiation, a significant decrease in MMP was observed in DDE-affected cells at both 1 μM and 10 μM concentrations compared to medium containing DMSO alone. In cells affected with 1 μM DDE, there was a significant increase in red/green ratio on day 21 of differentiation compared to cells exposed to DMSO alone (Figure 7).

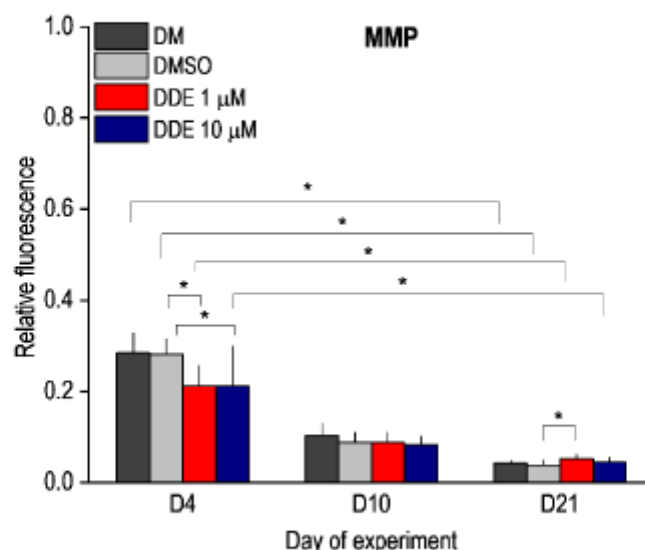


Figure 7. Mitochondrial membrane potential (MMP) during adipocyte differentiation in media containing no additive (DM) or DMSO, DMSO, and 1 μM *p,p'*-DDE, and DMSO and 10 μM *p,p'*-DDE on days 4, 10, and 21 of the experiment. Significant differences * $p < 0.05$ (Friedman and Wilcoxon rank sum tests). On the fourth day of differentiation, a significant decrease in MMP was observed in DDE-affected cells at both 1 μM and 10 μM concentrations compared to medium containing DMSO alone. In cells affected with 1 μM DDE, there was a significant increase in MMP on day 21 of differentiation compared to control cells exposed to DMSO alone.

4. Discussion

In our study, we monitored chronic DDE exposure at two different concentrations to a developing adipocytes differentiating from hADMSCs. We found that the long-lasting treatment with DDE in a concentration of 1 μM in contrast to 10 μM resulted in statistically significant deviations in mitochondrial respiration compared to control cells. The characteristic pattern of changes in mitochondrial respiration during adipogenesis was not impaired by lower DDE concentration showing a typical gradual increase in the routine and leak respirations of maturing adipocytes [3]. However, on day 21 of the experiment—i.e., in adipocytes regarded as fully differentiated—higher mitochondrial membrane potential, higher resting mitochondrial oxygen consumption (routine respiration), and higher ATP-related respiration (R-L) were observed in DDE 1 μM samples compared to relevant controls. Our results suggest that lower concentrations of the pollutant during chronic exposure may more significantly modulate physiological processes, in this case probably through an endocrine disrupting effect. Such a finding might seem surprising since the majority of studies dealing with the impact of organochlorines on mitochondrial functions reported impaired oxygen consumption of the tissues studied [27–31]; reviewed in [12]. However, it should be noted that the concentrations of DDT and DDE used in these studies were relatively high and their effects were analyzed mainly on the liver and muscle mitochondria after a single dose exposure. The design of our experiment differs in the chronicity of exposure, lower concentrations of the pollutant used, the continuous action of DDE on the whole process of adipocyte differentiation until maturation, and the type of affected cells.

Appropriate mitochondrial function in general and oxidative phosphorylation in particular is essential for ATP production and the whole-body energy homeostasis. Mitochondrial dysfunction has been implicated in the development of many pathological

conditions associated with obesity as a result of imbalance between food intake and energy expenditure, such as type 2 diabetes mellitus. Nevertheless, mitochondrial dysfunction does not necessarily mean that mitochondrial oxygen consumption and ATP production should be decreased in all tissues involved in the regulation of energy homeostasis. Tissue-specific control of mitochondrial respiration was demonstrated in obese diabetic mice displaying impaired mitochondrial respiration in the liver and oxidative skeletal muscle, but enhanced oxygen consumption in glycolytic skeletal muscle [32]. Another study reported increased mitochondrial oxygen consumption in the brown fat of obese mice [33]. In addition, adipocyte-specific decrease in oxidative phosphorylation affected systemic energy homeostasis and protected against the development of obesity and insulin resistance in mice fed a high-fat diet [34]. In the study conducted by Böhm et al. (2020), enhanced mitochondrial respiration of adipocytes isolated from obese insulin-resistant donors was attributed to adaptation of the cellular metabolism to the increased amount of fuels associated with insulin resistance [35].

In our study, the supply of metabolic substrates was the same in all experimental groups; however, increased ATP demand in DDE-treated adipocytes could be related to the promoting effect of DDE and similar pollutants on the *de novo* synthesis of lipids and their accumulation [36]. The negative effects of DDT/DDE on thermogenic proteins expression and substrate transport/utilization in adipocytes were also documented, which could lead to an increased ATP need to compensate for compromised fuel transport or heat dissipation [37]. A recent study suggests that impaired thermogenesis in DDT-affected adipocytes could be caused by targeting mechanisms upstream of adipose tissue without the necessity to compromise the expression of uncoupling proteins [38]. In this study, the leak respiration needed to compensate for proton leak, electron slip, and cation cycling increased in the course of adipocyte differentiation in all groups to a similar extent, without reaching any significant difference between DDE-treated and control groups on day 21.

The excess E-R capacity (respiratory reserve) was the only parameter compromised by the long-lasting exposure to DMSO (between days 10 and 21 of differentiation). Nevertheless, the same trend was observed in DDE-treated adipocytes on day 21 verifying our previous finding that in the later stages of differentiation, the routine respiration could be increased only on the account of the total electron-transporting capacity of mitochondria [3]. In addition, the ratio of routine to maximal respiration (R/E) was nearly the same in DMSO-control and DDE-treated adipocytes on day 21 of the experiment and in all these groups it reached significantly higher values than on day 10 of differentiation.

Another interesting finding of this study is the fact that at higher concentration, i.e., 10 μ M, DDE seemed to have no effect, since on day 21, no significant differences were revealed between DDE 10 μ M and control adipocytes. However, DDE 10 μ M-exposed differentiating adipocytes displayed a later onset of changes in mitochondrial parameters associated with normal adipogenesis, i.e., an increase in routine respiration and ATP-linked oxygen consumption. Such "bidirectional" action of various pollutants on the cellular functions is not a new finding and makes the research into the putative effects of endocrine disruptors more complicated [39].

Thus, evaluating the impact of DDE on mitochondrial functions in human differentiating adipocytes, adipogenesis can be attacked in two ways: (i) at higher DDE concentrations by slowing down the differentiation process, (ii) at lower chronic DDE levels by increased mitochondrial respiration and ATP generation, which then could lead to disturbances in energy homeostasis.

Mitochondrial dysfunction of the adipocyte may then be involved in the pathogenesis of obesity-related metabolic diseases, such as diabetes mellitus, in particular if the supply of metabolic substrates is increased simultaneously. Overexposure of cells to saturated fatty acids, which is also associated with higher exposure to DDT and DDE from food of animal origin might aggravate mitochondrial dysfunction of other tissues and contribute to disturbances of the whole-body energy balance [40].

5. Study Limitations

This study addressed the impact of persistent organochlorine pollutant p,p'-DDE on mitochondrial respiration in a single cell model. However, the adipocytes differentiating from hADMSCs have only limited survival time and cannot provide complex insight into impaired regulation of the functions of adipose tissue exposed to potential obesogens for the whole life. In future studies, long-lasting exposure to the pollutant should be extended to in vivo models to verify the putative disrupting effect of the compound on energy homeostasis and to specify the mechanism by which it could contribute to obesity and related diseases.

6. Conclusions

Elucidating the cellular and molecular mechanisms of DDE obesogenic effects is critical to understand the putative causal relationship of DDE to obesity and its metabolic complications.

This study focused on the impact of DDE on the metabolic characteristic of hADMSCs in the whole course of differentiation (21 days). Its results show that subtle sequelae of DDE chronic action could be observed at the end of differentiation, i.e., after long-lasting exposure. Maturing adipocytes "adapted" to continuous supply of the pollutant in lower doses (1 μ M), displayed higher basal mitochondrial respiration and ATP-linked oxygen consumption along with impaired uncoupling reflected in higher mitochondrial membrane potential that might interfere with efficient heat dissipation. A higher concentration of the pollutant slows down the differentiation process, as documented by the later onset of the increase in ATP-linked oxygen consumption.

In conclusion, the hADMSCs in vitro model of differentiation is suitable to study the impact of chronic DDE exposure on different features of adipogenesis. The long-lasting action of DDE seems to result in metabolic reprogramming of adipocytes that might contribute to the obesogenic effect of the pollutant studied.

Author Contributions: Conceptualization, D.M. and J.K.; funding acquisition, D.M., L.M., and J.K.; formal analysis, L.K., L.M., D.M., and J.K.; investigation, all authors; methodology, all authors; project administration, D.M.; resources, J.K., D.M.; supervision, D.M. and J.K.; validation, all authors; writing—original draft preparation; writing—review and editing, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267, "Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)", awarded by the MEYS CR, financed from ERDF CZ, Charles University Research Fund (Progres Q39), project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 Fighting Infectious Diseases awarded by the MEYS CR, financed from EFRR, and the Specific Student Research Project Nr 260538/2020 of Charles University.

Data Availability Statement: Data available on request due to privacy restrictions. The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the co-ownership of multiple workplaces.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rosenwald, M.; Perdikari, A.; Rüllicke, T.; Wolfrum, C. Bi-Directional Interconversion of Brite and White Adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 659–667. [CrossRef] [PubMed]
2. Tang, Q.Q.; Lane, M.D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 715–736. [CrossRef]
3. Kladnická, I.; Čedíková, M.; Kripnerová, M.; Dvořáková, J.; Kohoutová, M.; Tůma, Z.; Müllerová, D.; Kuncová, J. Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue. *Physiol. Res.* **2019**, *S287–S296*. [CrossRef] [PubMed]
4. Wang, L.; Hu, J.; Zhou, H. Macrophage and Adipocyte Mitochondrial Dysfunction in Obesity-Induced Metabolic Diseases. *World J. Mens Health* **2020**, *38*, e53. [CrossRef]
5. Müller, S.; Kulenkampff, E.; Wolfrum, C. Adipose Tissue Stem Cells. In *Metabolic Control*; Herzig, S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; Volume 233, pp. 251–263, ISBN 978-3-319-29804-7.

6. Wellen, K.E.; Hotamisligil, G.S. Inflammation, Stress, and Diabetes. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1111–1119. [CrossRef] [PubMed]
7. Berg, A.H.; Scherer, P.E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 939–949. [CrossRef]
8. Armani, A.; Mammi, C.; Marzolla, V.; Calanchini, M.; Antelmi, A.; Rosano, G.M.C.; Fabbri, A.; Caprio, M. Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *110*, 564–572. [CrossRef]
9. Kwan, H.Y.; Chao, X.; Su, T.; Fu, X.-Q.; Liu, B.; Tse, A.K.W.; Fong, W.F.; Yu, Z.-L. Dietary Lipids and Adipocytes: Potential Therapeutic Targets in Cancers. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 303–311. [CrossRef]
10. Speakman, J.R.; O'Rahilly, S. Fat: An Evolving Issue. *Dis. Models Mech.* **2012**, *5*, 569–573. [CrossRef]
11. Li, X.; Qi, L. Gene-Environment Interactions on Body Fat Distribution. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3690. [CrossRef]
12. Elmore, S.E.; La Merrill, M.A. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 122. [CrossRef]
13. Smeds, A.; Saukko, P. Identification and Quantification of Polychlorinated Biphenyls and Some Endocrine Disrupting Pesticides in Human Adipose Tissue from Finland. *Chemosphere* **2001**, *44*, 1463–1471. [CrossRef]
14. Dirinck, E.L.; Dirlu, A.C.; Govindan, M.; Covaci, A.; Gaal, L.F.V.; Jorens, P.G. Exposure to Persistent Organic Pollutants: Relationship With Abnormal Glucose Metabolism and Visceral Adiposity. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 1951–1958. [CrossRef] [PubMed]
15. Guo, W.; Pan, B.; Sakkiah, S.; Yavas, G.; Ge, W.; Zou, W.; Tong, W.; Hong, H. Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 4361. [CrossRef]
16. Franco, M.E.; Fernandez-Luna, M.T.; Ramirez, A.J.; Lavado, R. Metabolomic-Based Assessment Reveals Dysregulation of Lipid Profiles in Human Liver Cells Exposed to Environmental Obesogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2020**, *398*, 115009. [CrossRef]
17. Rylander, L.; Nilsson-Ehle, P.; Hagmar, L. A Simplified Precise Method for Adjusting Serum Levels of Persistent Organohalogen Pollutants to Total Serum Lipids. *Chemosphere* **2006**, *62*, 333–336. [CrossRef]
18. Cano-Sancho, G.; Salmon, A.G.; La Merrill, M.A. Association between Exposure to *p,p'*-DDT and Its Metabolite *p,p'*-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 096002. [CrossRef]
19. Müllerová, D.; Kopecký, J. White Adipose Tissue: Storage and Effector Site for Environmental Pollutants. *Physiol. Res.* **2007**, *56*, 375–381. [PubMed]
20. Moreno-Aliaga, M.J.; Matsumura, F. Effects of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(p-Chlorophenyl)-Ethane (*p,p'*-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A Adipocyte Differentiation. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 997–1007. [CrossRef]
21. Chen, J.-Q.; Brown, T.R.; Russo, J. Regulation of Energy Metabolism Pathways by Estrogens and Estrogenic Chemicals and Potential Implications in Obesity Associated with Increased Exposure to Endocrine Disruptors. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 1128–1143. [CrossRef] [PubMed]
22. Ferreira, E.M.L.; Madeira, V.M.C.; Moreno, A.J. Interactions of 2,2-Bis(p-Chlorophenyl)-1,1-Dichloroethylene with Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 299–308. [CrossRef]
23. Liu, Q.; Wang, Q.; Xu, C.; Shao, W.; Zhang, C.; Liu, H.; Jiang, Z.; Gu, A. Organochloride Pesticides Impaired Mitochondrial Function in Hepatocytes and Aggravated Disorders of Fatty Acid Metabolism. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46339. [CrossRef] [PubMed]
24. Tohru, O.; Tetsuo, T.; Hiroshi, O. Effects of Dichlorodiphenyltrichloroethane and Its Analogues on Rat Liver Mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 397–404. [CrossRef]
25. Rodríguez-Burford, C.; Oelschläger, D.K.; Talley, L.L.; Barnes, M.N.; Partridge, E.E.; Grizzle, W.E. The Use of Dimethylsulfoxide as a Vehicle in Cell Culture Experiments Using Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Biotech. Histochem.* **2003**, *78*, 17–21. [CrossRef]
26. Oikonomopoulos, A.; van Deen, W.K.; Manansala, A.-R.; Lacey, P.N.; Tomakili, T.A.; Ziman, A.; Hommes, D.W. Optimization of Human Mesenchymal Stem Cell Manufacturing: The Effects of Animal/Xeno-Free Media. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16570. [CrossRef] [PubMed]
27. Khanna, S.; Singh, N.; Brave, V. Natural Dyes versus Lysochrome Dyes in Cheiloscopy: A Comparative Evaluation. *J. Forensic Dent. Sci.* **2010**, *2*, 11. [CrossRef]
28. Furuhashi, M.; Saitoh, S.; Shimamoto, K.; Miura, T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin. Med. Insights Cardiol.* **2014**, *8s3*, CMC.S17067. [CrossRef] [PubMed]
29. Zhang, Y.; Marsboom, G.; Toth, P.T.; Rehman, J. Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77077. [CrossRef]
30. Byczkowski, J.Z. The Mode of Action of *p,p'*-DDT on Mammalian Mitochondria. *Toxicology* **1976**, *6*, 309–314. [CrossRef]
31. La Merrill, M.; Birbaum, L.S. Childhood Obesity and Environmental Chemicals. *Mt. Sinai J. Med. A J. Transl. Pers. Med.* **2011**, *78*, 22–48. [CrossRef]
32. Holmström, M.H.; Iglesias-Gutierrez, E.; Zierath, J.R.; Garcia-Roves, P.M. Tissue-Specific Control of Mitochondrial Respiration in Obesity-Related Insulin Resistance and Diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, E731–E739. [CrossRef] [PubMed]
33. Alcalá, M.; Calderon-Dominguez, M.; Bustos, E.; Ramos, P.; Casals, N.; Serra, D.; Viana, M.; Herrero, L. Increased Inflammation, Oxidative Stress and Mitochondrial Respiration in Brown Adipose Tissue from Obese Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
34. Choi, M.J.; Jung, S.-B.; Lee, S.E.; Kang, S.G.; Lee, J.H.; Ryu, M.J.; Chung, H.K.; Chang, J.Y.; Kim, Y.K.; Hong, H.J.; et al. An Adipocyte-Specific Defect in Oxidative Phosphorylation Increases Systemic Energy Expenditure and Protects against Diet-Induced Obesity in Mouse Models. *Diabetologia* **2020**, *63*, 837–852. [CrossRef] [PubMed]

35. Böhm, A.; Keuper, M.; Meile, T.; Zdichavsky, M.; Fritsche, A.; Häring, H.-U.; de Angelis, M.H.; Staiger, H.; Franko, A. Increased Mitochondrial Respiration of Adipocytes from Metabolically Unhealthy Obese Compared to Healthy Obese Individuals. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
36. Kim, J.; Sun, Q.; Yue, Y.; Yoon, K.S.; Whang, K.-Y.; Marshall Clark, J.; Park, Y. 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) Promote Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte Cell Culture. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2016**, *131*, 40–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; Sul, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 783–809. [[CrossRef](#)]
38. vonderEmbse, A.N.; Elmore, S.E.; Jackson, K.B.; Habecker, B.A.; Marz, K.E.; Pennell, K.D.; Lein, P.J.; La Merrill, M.A. Developmental Exposure to DDT or DDE Alters Sympathetic Innervation of Brown Adipose in Adult Female Mice. *Environ. Health* **2021**, *20*. [[CrossRef](#)]
39. Nevoral, J.; Kolinko, Y.; Moravec, J.; Žalmanová, T.; Hošková, K.; Prokešová, Š.; Klein, P.; Ghaibour, K.; Hošek, P.; Štiavnická, M.; et al. Long-Term Exposure to Very Low Doses of Bisphenol S Affects Female Reproduction. *Reproduction* **2018**, *156*, 47–57. [[CrossRef](#)]
40. Hirabara, S.M.; Curi, R.; Maeckler, P. Saturated Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle Cells. *J. Cell. Physiol.* **2010**, *222*, 187–194. [[CrossRef](#)]

Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue

I. KLADNICKÁ^{1,2}, M. ČEDÍKOVÁ^{3,4}, M. KRIPNEROVÁ⁵, J. DVOŘÁKOVÁ⁶,
M. KOHOUTOVÁ^{3,4}, Z. TŮMA⁴, D. MÜLLEROVÁ^{1,2}, J. KUNCOVÁ^{3,4}

Physiol. Res. 68 (Suppl. 3): S287-S296, 2019

<https://doi.org/10.33549/physiolres.934353>

Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue

I. KLADNICKÁ^{1,2}, M. ČEDÍKOVÁ^{3,4}, M. KRIPNEROVÁ⁵, J. DVOŘÁKOVÁ⁶,
M. KOHOUTOVÁ^{3,4}, Z. TŮMA⁴, D. MÜLLEROVÁ^{1,2}, J. KUNCOVÁ^{3,4}

¹Department of Public Health and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ²NTIS, European Center of Excellence New Technologies for the Information Society, University of West Bohemia, Pilsen, Czech Republic, ³Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁴Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁵Institute of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic, ⁶Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

Received March 21, 2019

Accepted October 4, 2019

Summary

Burden of obesity is increasing in the contemporary world. Although multifactorial in origin, appropriate mitochondrial function of adipocytes emerges as a factor essential for healthy adipocyte differentiation and adipose tissue function. Our study aimed to evaluate mitochondrial functions of human adipose-derived mesenchymal stem cells committed to adipogenesis. On days 0, 4, 10, and 21 of adipogenesis, we have characterized adipocyte proliferation and viability, quantified lipid accumulation in maturing cells, performed qualitative and quantitative analysis of mitochondria, determined mitochondrial respiration of cells using high-resolution respirometry, and evaluated mitochondrial membrane potential. In the course of adipogenesis, mitochondrial oxygen consumption progressively increased in states ROUTINE and E (capacity of the electron transfer system). State LEAK remained constant during first days of adipogenesis and then increased probably reflecting uncoupling ability of maturing adipocytes. Citrate synthase activity and volume of mitochondrial networks increased during differentiation, particularly between days 10 and 21. In addition, lipid accumulation remained low until day 10 and then significantly increased. In conclusion, during first days of adipogenesis, increased mitochondrial respiration is needed for transition of differentiating cells from glycolytic to oxidative metabolism and clonal expansion of preadipocytes and then more energy is needed to acquire typical metabolic phenotype of mature adipocyte.

Key words

Mesenchymal stem cells • Adipocyte • Adipogenesis • High-resolution respirometry • Mitochondria

Corresponding author

J. Kuncová, Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic. E-mail: jitka.kuncova@fp.cuni.cz

Introduction

Obesity represents an increasing problem of the contemporary world. It leads to various chronic morbidities like Type 2 diabetes mellitus, hypertension, atherosclerosis, heart disease, stroke, cancer, infertility etc. (Cai *et al.* 2010, Castro *et al.* 2014, Luna-Luna *et al.* 2015, Mission *et al.* 2015, Zimmet *et al.* 2001). Caloric intake exceeding energy expenditure produces a metabolic state that promotes hypertrophy and hyperplasia of adipocytes (Shepherd *et al.* 1993). It is supposed that the increase in adipocyte number is triggered by signaling factors that induce the commitment of pluripotent mesenchymal stem cells residing in the vascular stroma to the adipocyte lineage. When committed, preadipocytes are subjected to mitotic clonal expansion undergoing two or three cell divisions and then they gradually acquire typical adipocyte metabolic and

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 0862-8408 (print) • ISSN 1802-9973 (online)

© 2019 Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Fax +420 241 062 164, e-mail: physres@fgn.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres

morphological characteristic in the process of differentiation (Tang and Lane 2012). All three stages are essential for the development of obesity and they are tightly linked to the increased energy intake over long time periods (Qiao *et al.* 2019, Shepherd *et al.* 1993, Spiegelman and Flier 1996).

Appropriate function of white adipose tissue is dependent on energy provided by mitochondria (Kusminski and Scherer 2012). It has been also suggested that adipocyte differentiation is at least partly driven by mitochondrial oxidative phosphorylation (Luz *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2013).

To study adipogenesis *in vitro*, 3T3-L1 preadipocyte cell line originally derived as a subclone of the 3T3 mouse embryonic fibroblast cell line is widely used in experimental practice and some data are also available on mitochondrial respiration of these cells (Morrison and McGee 2015). However, the translation potential of the experimental results acquired from these cells has been challenged by several important issues (Sadie-Van Gijsen 2019).

Human cell models include various types of stem cells that are able to differentiate into adipocytes, namely adipose tissue derived mesenchymal stem cells that allow investigation of all phases of adipocyte formation. Despite concerns expressed by some investigators (Berry *et al.* 2014), these cells represent a more relevant model suitable for research in adipocyte biology than most rodent cell lines (Sadie-Van Gijsen 2019).

The aim of our study was to extend earlier observations of other researchers in the field of mitochondrial physiology of differentiating human adipocytes. We have used human adipose-derived mesenchymal stem cells committed to adipogenesis and on days 0, 4, 10 and 21 of differentiation, we have characterized their proliferation and viability, quantified lipid accumulation in maturing cells, performed qualitative and quantitative analysis of mitochondria, determined mitochondrial respiration of cells using high-resolution respirometry, and evaluated mitochondrial membrane potential.

Methods

Cell culture and differentiation

Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADMSCs), isolated from a female donor from subcutaneous adipose tissue and characterized by flow cytometry were purchased from Thermo Fisher (Thermo

Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and cultivated as described previously (Mullerova *et al.* 2017). Briefly, the cells were seeded at 1×10^5 cells and cultured in Petri dishes (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in commercially available culture medium MesenPRO R5™ Medium supplemented with MesenPRO R5™ Growth Supplement with reduced serum level (2%), 1% L-glutamine and 1% gentamicin (all Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

After 80% confluence was reached, the hADMSCs were cultured for adipogenic differentiation in culture plates according to the manufacturer's instructions in StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal Medium (DM) with StemPro® Adipogenesis Supplement and 1% gentamicin (all Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). The medium was changed every 3 days up to a total incubation time of 21 days. The cells were maintained and cultured into differentiated adipocytes under 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

Cell proliferation

Human adipose-derived stem cells were seeded at 5000 per well on the bottom of 96 dark well plate and treated as described above. Samples were labeled on days 0, 4, 10, 21 using NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). All samples were scanned using the Olympus IX83 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a VisiScope Live Cell Image system at 100× magnification. The images were analyzed using the ImageJ (Fiji) software.

Cell viability

PrestoBlue™ cell viability reagent (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) was used to evaluate the viability and proliferation of cells (Dejmek *et al.* 2019). The reagent uses mitochondrial activity to reduce the non-fluorescent blue resazurin to the fluorescent pink resofurin. PrestoBlue™ reagent (10 µl) was added to 90 µl medium with cells on 96 dark well plate. Cells were incubated for 10 min at 37 °C. The bottom-read fluorescence was read at 560 nm (excitation) and 590 nm (emission) by Synergy™ HT microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

Differentiation and maturation of adipocytes

1. Oil Red O staining

Human adipose-derived stem cells were stained using Oil Red O solution which stains intracellular

triglyceride droplets. Medium was removed from each well, cells were twice rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 4 % formaldehyde prepared in PBS for 1 h at room temperature. Then the cells were washed twice in distilled water and stained in Oil Red O solution. This solution was prepared dissolving 0.5 g of Oil Red O powder (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) in 100 ml of isopropanol (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), filtered with absorbent paper and blended in the ratio 3:2 – three parts of 0.5 % Oil Red O solution and two parts of distilled water. The cells were incubated for 15 min with the Oil Red O solution at room temperature, twice washed in distilled water to remove unbound dye and the cells were then visualized using an inverted microscope Olympus CX41 (Olympus, Tokyo, Japan) connected to a digital camera.

2. Quantification of lipid accumulation

Lipid accumulation was measured by Oil Red O extraction by lysis and gentle agitation 10 min at room temperature. We used 4 % NP-40 (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) in 100 % isopropanol as a lysis buffer. The extract (100 μ l) was transferred into a 96 well plate. The absorbance was measured at 490 nm using a plate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA).

3. Indirect immunofluorescence

Cells were washed in PBS, fixed for 60 min in 4 % formaldehyde with PBS at room temperature, and permeabilized in PBS containing 0.3 % Triton X-100 for 15 min followed by blocking in PBS with 1 % bovine serum albumin (BSA) and 10 % normal donkey serum at room temperature for 60 min. After blocking, the cells were incubated with antibody against fatty acid binding protein 4 (FABP4; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in working solution (PBS containing 0.03 % Triton X-100, 1 % BSA, 10 % normal donkey serum and anti-FABP4 in final concentration 10 μ g/ml) overnight at 2–8 °C. After three 5-min rinsing in PBS with 1 % BSA, cells were incubated for 1 h in donkey anti-goat IgG NorthernLights™ NL557-conjugated secondary antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluted 1:200 in 1 % BSA in PBS in the dark for 60 min at room temperature. The coverslips were washed, placed on microscope slides with a mounting medium (ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and visualized with a fluorescence microscope Olympus CX41 (Olympus, Tokyo, Japan) connected to a digital camera.

Qualitative and quantitative analysis of mitochondria

1. Fluorescent probe staining

Fluorescent probes, MitoTracker™ Red CMXRos and NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (both Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were used to visualize mitochondria and nucleus. To label mitochondria, cells were incubated with MitoTracker™, which passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria. Cell-permeant nuclear counterstain NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent containing Hoechst® 33342 dye (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) emits blue fluorescence when bound to DNA with an emission maximum at 460 nm. It is detected through a blue/cyan filter.

Culture medium was replaced with Live Cell Imaging Solution (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Two drops of NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent were added per milliliter of medium and MitoTracker™ was added in the final concentration 100 nM. Cells were incubated in the dark for 30 min and then visualized by the Hamamatsu Orca-ER camera mounted on the Olympus IX 81 inverted microscope at 200 \times magnification (Olympus, Tokyo, Japan).

2. High-resolution respirometry

Oxygen consumption by adipocytes was evaluated on days 0 (n=6), 4 (n=17) and 21 (n=18) of differentiation. To measure mitochondrial respiration of intact cells, oxygraph Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Austria) connected to the computer with DatLab software for data acquisition and analysis (Oroboros, Innsbruck, Austria) was used. The oxygen flux was calculated as a negative time derivative of the oxygen concentration in 2 ml glass chambers at 37 °C (Pesta and Gnaiger 2012).

StemPro® Adipogenesis Differentiation medium was stirred at 350 rpm and equilibrated with air for 60 min. After closing the chambers, the samples of intact adipocytes were injected into the chambers using Hamilton® syringe and respiratory activity of intact cells was assessed as routine respiration (ROUT; R). Then, non-phosphorylating LEAK state (L; oxygen consumption needed for electron transport compensating for proton leak across the inner mitochondrial membrane) was induced by addition of oligomycin (2.5 μ mol/l), an ATP-synthase inhibitor. Maximum capacity of the electron transfer system (state E), was reached by titration of uncoupler trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazone

(FCCP; 0.05 $\mu\text{mol/l}$ titration steps). Oxygen consumption was then inhibited by inhibitor of complex III antimycin A (2.5 $\mu\text{mol/l}$) to achieve residual oxygen consumption (ROX). The cells were counted using Bürker's hemocytometer (average cell count was $\sim 4 \times 10^5$ cells per chamber) and oxygen consumption was expressed in $\text{pmol O}_2/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ cells})$ and corrected to ROX and instrumental background. The used protocol is shown in Figure 4A.

3. Citrate synthase activity

Determination of citrate synthase activity was used to estimate mitochondrial content in the samples from each oxygen chamber. Two hundred microliters of the mixed and homogenized chamber content were added to 800 μl of the assay medium containing 0.1 mmol/l 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid, 0.25 % Triton-X, 0.5 mmol/l oxaloacetate, 0.31 mmol/l acetyl coenzyme A, 5 $\mu\text{mol/l}$ EDTA, 5 mmol/l triethanolamine hydrochloride, and 0.1 mol/l Tris-HCl, pH 8.1 (Kuznetsov *et al.* 2002). The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 412 nm and 30 °C over 200 s and expressed in mIU per 10^6 cells

4. Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential was measured using the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Mitosciences, Abcam, Cambridge, UK). The cells were seeded at 1×10^4 cells on a dark well plate and cultured as explained earlier. The mitochondrial membrane potential was evaluated on days 0 ($n=12$), 4 ($n=12$), 10 ($n=12$) and 21 ($n=12$) of differentiation. The cells were washed once with PBS and incubated with JC-1 dye (1 μM) at 37 °C for 10 min. Then the cells were rinsed twice and were analyzed on a fluorescence spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA) at excitation 475 nm and emission 530/590 nm. In addition, the changes in mitochondrial membrane potential were also analyzed by flow cytometer (FACSCanto II; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). JC-1 solution (10 μl at the concentration of 200 μM) was added to cell suspension (1 ml) and cells were incubated at 37 °C for 25 min. Washing with PBS and centrifugation (1500 rpm; 5 min) followed the incubation period. The supernatant was removed; the pellet was resuspended in 500 μl PBS and immediately measured on the flow cytometer. The red/green fluorescence intensity ratio was determined to evaluate mitochondrial membrane potential.

Data analysis and statistics

Statistical analysis was performed using OriginPro 2017 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). After testing for normality of distribution, data were compared using one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Cell culture and differentiation

Human adipose-derived stem cells (hADMSCs) were maintained and cultured into differentiated adipocytes under standard conditions for 21 days. Cells harvested on day 0 were mesenchymal stem cells with typical fibroblastic spindle shape with several spurs and large nucleus. During adipogenic differentiation, cell morphology has changed – the cells gradually increased in volume, small fat vacuoles began to appear and then gradually increased in size (Fig. 1A-D). The phenotype of mature adipocytes was confirmed by the presence of FABP4 protein.

Cell proliferation and viability

As shown in Figure 2, a trend to increase the cell number was observed just after induction of differentiation (day 0 vs. day 4, $p=0.05004$) and it became significant thereafter (day 0 vs. day 10, $p=0.006$; day 0 vs. day 21, $p<0.0001$). In the later course of adipogenesis, mitotic division has slowed down (day 10 vs. day 21, $p>0.05$). This corresponds to our other results, where lipid accumulation is observed instead of mitotic division in the second phase of differentiation.

Cell viability determined by PrestoBlue™ reagent was expressed in fluorescent units (FU). No statistically significant changes in cell viability were observed during differentiation (Fig. 3).

Quantification of lipid accumulation

Oil Red O solution has been used to stain adipocytes and to visualize fat droplets. Oil Red O interacts with lipids to give a red-orange colored product. During differentiation, an insignificant increase in the fat content of the cells was observed and then, between days 10 and 21, fat accumulation significantly increased which corresponded to the increasing amount of measured Oil Red O staining (Figs 1A-D and 3C). The data are in accord with our previous finding that at this time, no significant mitotic division is taking place, but rather acquiring mature adipocyte-specific metabolic phenotype.

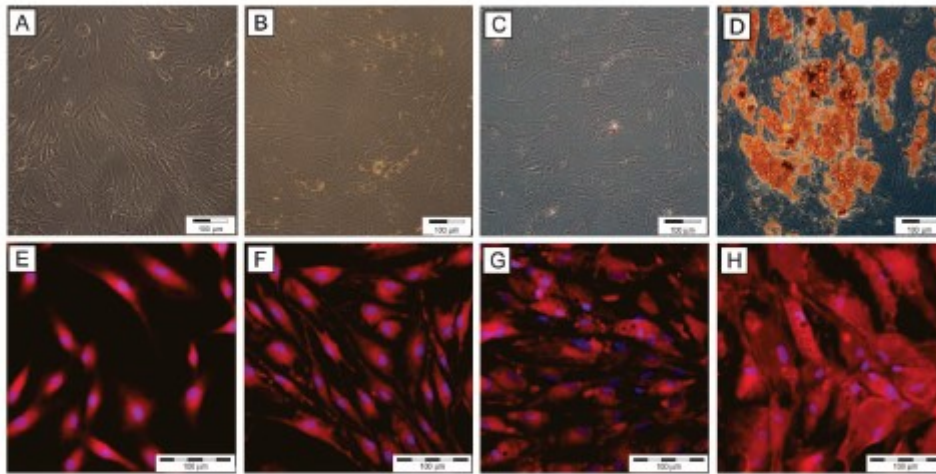


Fig. 1. Adipocyte differentiation (A-D) and mitochondria analysis using MitoTracker™ (E-H). (A) Human adipose-derived mesenchymal stem cells stained with Oil Red O. (B-D) Adipocytes stained with Oil Red O on days 4, 10, and 21 of differentiation. (E) Mitochondria in human adipose-derived mesenchymal stem cells stained using MitoTracker™. (F-H) Mitochondria in adipocytes on days 4, 10, and 21 of differentiation stained by MitoTracker™.

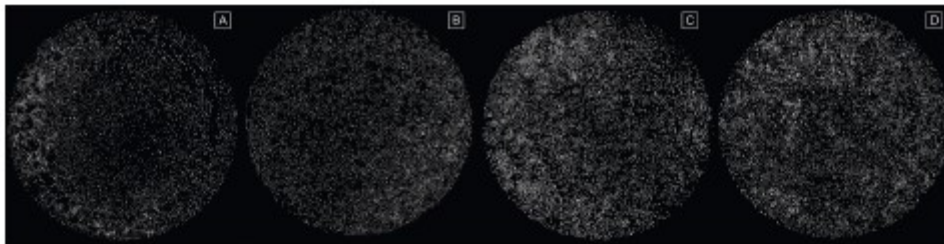


Fig. 2. Quantification of the number of cell nuclei (NucBlue®) in the course of adipocyte differentiation from human adipose-derived mesenchymal stem cells on days 0 (A), 4 (B), 10 (C), and 21 (D).

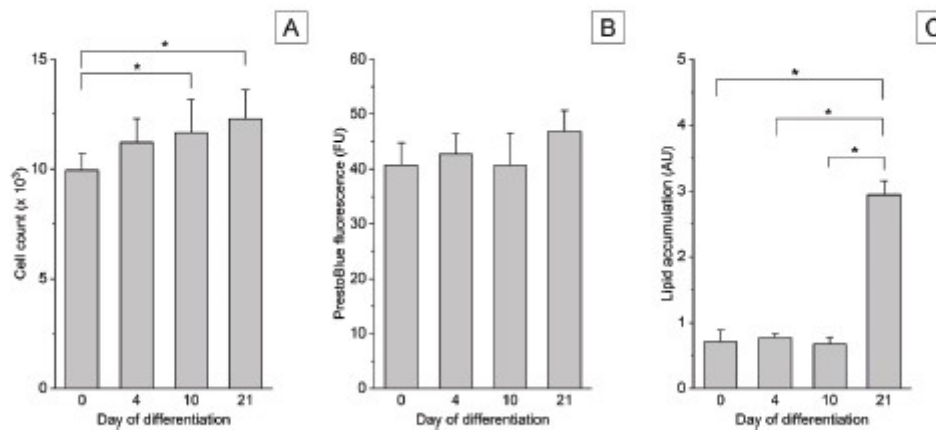


Fig. 3. (A) Proliferation (NucBlue®), (B) cell viability (PrestoBlue™), and (C) lipid accumulation (Oil Red O) in adipocytes differentiating from human adipose-derived mesenchymal stem cells on days 0, 4, 10, and 21 of differentiation.

Qualitative and quantitative analysis of mitochondria

Fluorescence microscopy showed that during the adipocyte differentiation, the volume of mitochondrial networks apparently increased (Fig. 1E-H). These data corresponded with the results of determination of the citrate synthase activity. At the end of the differentiation, citrate synthase activity was 92.7 ± 33.5 mIU/ 10^6 cells and it was significantly higher than on day 4 (17.9 ± 4.5 mIU/ 10^6 cells) and day 0 (19.3 ± 0.8 mIU/ 10^6 cells). The data suggest increasing mitochondrial quantity during differentiation.

High-resolution respirometry

As shown in Figure 4B-D, respirometric parameters have significantly changed in the course of

adipogenesis. Basic respirometric states, i.e. R, L and E progressively increased in the course of differentiation (Fig. 4B). Interestingly, the most abrupt change of the state LEAK was observed between days 4 and 21. ATP-related oxygen consumption (R-L) and excess ETS capacity (E-R) increased significantly between days 0 and 4 and then they did not substantially change (Fig. 4C). LEAK control ratio, expressed as L/E was not different between days 0 and 4 of adipocyte differentiation and then it significantly increased on day 21. NetROUTINE control ratio expressing oxygen consumption related to ATP production (R-L) as a fraction of ETS capacity ((R-L)/E) increased between days 0 and 4 of the cell differentiation and then remained constant (Fig. 4D).

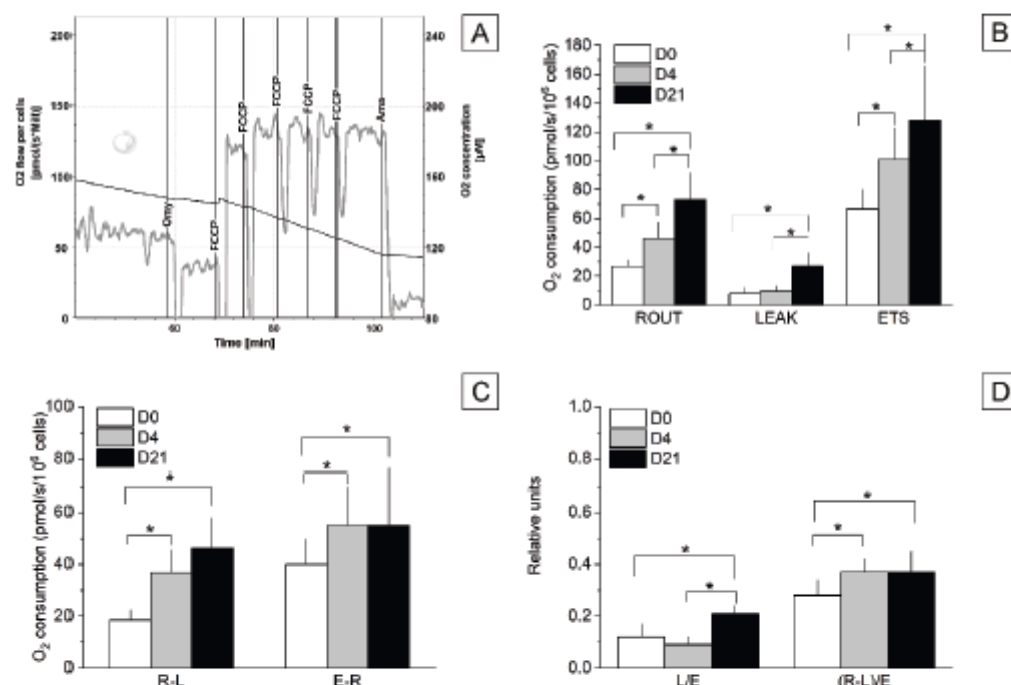


Fig. 4. Mitochondrial respiration in differentiating adipocytes on days 0, 10, and 21 of adipogenesis. **(A)** Titration protocol in adipocytes on day 21 of differentiation. Grey line—oxygen flux expressed in pmol/s per 10^6 cells. Black line—concentration of oxygen in the oxygen chamber ($\mu\text{mol/l}$). Omy—oligomycin, FCCP—trifluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone, Ama—antimycin A. **(B)** Routine (R), LEAK (L), and uncoupled (E) oxygen consumption after addition of cells, Omy, and FCCP, respectively, after correction to residual oxygen consumption after Ama. **(C)** ATP-related oxygen consumption (R-L) and excess ETS capacity (E-R). **(D)** Flux control ratios documenting coupling state (L/E) and NetROUTINE control ratio ((R-L)/E). Significant differences $p < 0.05$ (*).

Mitochondrial membrane potential

JC-1 dye is widely used to monitor mitochondrial health by measuring mitochondrial membrane potential. The low mitochondrial membrane

potential is characterized by green fluorescence while high membrane potential is red. Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence intensity ratio. We observed

a decrease of this ratio during differentiation of hADMSCs to adipocytes by spectrophotometer assay (ratio 1.55 and 0.24 on days 4 and 21, respectively). The same trend was confirmed by flow cytometry (the ratio 3.19 on day 4 and 2.33 on day 21). The decrease of red fluorescence during differentiation is a signal of the mitochondrial depolarization and this trend fully corresponds to the results of high-resolution respirometry.

Discussion

The present study describes the increasing cellular oxygen consumption during 21-day adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. It is well known that stem cells are highly glycolytic cells and have mechanisms that actively suppress mitochondrial respiration (Khacho and Slack 2017). Stem cells are probably less dependent on functional mitochondria for energy or metabolic needs but upon initiation of and during differentiation, a metabolic switch towards oxidative phosphorylation is necessary to get enough energy. This change must be logically accompanied by mitochondrial biogenesis. It appears that mitochondrial biogenesis and increased mitochondrial respiration is likely a general hallmark of adult stem cell differentiation (Hofmann *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013, Tang and Lane 2012).

Adipogenic differentiation of hADMSCs was induced using commercial culture medium and after four days, we observed very tiny lipid droplets. In differentiating cells, the number and size of lipid droplets increased the most abruptly between days 10 and 21 and this trend was documented by Oil Red O staining. The viability test quantifying reduction of the non-fluorescent resazurin to the fluorescent resorufin by the mitochondrial and cytoplasmic enzymes indicated that there was no trend to impaired cellular metabolism during adipocyte differentiation (Zalata *et al.* 1998).

All parameters associated with the potential ability of the cells to increase oxygen consumption, i.e. basic respirometric states, excess E-R capacity and ATP-related oxygen consumption (R-L) were significantly higher at the end of differentiation. Interestingly, the most abrupt changes of the state R-L and E-R were observed between days 0 and 4 and then they did not substantially change. This could be related to the fact that during the first four days of differentiation, the cells are able to divide and grow and their metabolic

needs are increased. The amount of mitochondria increased the most between days 4 and 10/21 suggesting that the transition from glycolytic to oxidative metabolism energy is very fast but for the change of cell phenotype more time is required (Drehmer *et al.* 2016, Tang and Lane 2012).

Mitochondrial uncoupling during differentiation led to mitochondrial membrane depolarization and as a result, increased LEAK oxygen consumption needed for compensation for the proton leak. This would lead to substantial suppression of ATP generation (Bouillaud *et al.* 1984). However, in the cells undergoing adipogenesis, state ROUTINE continuously increased maintaining capacity to produce ATP sufficient for the metabolic needs, e.g. fatty acid synthesis (Zhang *et al.* 2013). Excess E-R capacity reflecting the maximum ability of mitochondria to enhance electron transport, increased only between days 0 and 4 of adipocyte differentiation and then it remained constant implying that after day 4, routine respiration could be increased only on the account of total electron-transporting capacity of mitochondria. High LEAK state and L/E uncoupling ratio on day 21 of adipogenesis could be related to increased expression of the uncoupling proteins UCP1, UCP2 and UCP3, which are responsible for disconnection between oxygen consumption and ATP production (Zhang *et al.* 2013). Another factor contributing to the increased LEAK state in the later stages of adipocyte differentiation could be activation of the mitochondrial permeability transition pore induced by long exposure to dexamethasone, regular component of media used for adipogenic differentiation (Chen *et al.* 2016, Luan *et al.* 2019).

In addition, parameters quantifying amount of mitochondrial mass fully corresponded with the above mentioned statements. The volume of mitochondrial networks and citrate synthase activity, marker of mitochondrial content (Larsen *et al.* 2012) increased during differentiation. Moreover, perinuclear localization of mitochondria was typical for undifferentiated cells, whereas mitochondria of mature adipocytes were more evenly distributed in the cytoplasm, especially around the lipid vacuoles. This observation was in accord with the study of Hofmann *et al.* (2012) and it supports the theory that the changes in distribution of mitochondria network could be a marker of successful differentiation of hADMSCs.

In summary, we showed that adipogenic differentiation of hADMSCs is a complex phenomenon

regulated on multiple levels and it is accompanied by changes of the mitochondrial phenotype. It suggests that mitochondrial metabolism should not be considered as a consequence of differentiation but a key mechanism in this process. Regulation of mitochondrial respiration may be an important therapeutic approach that could be explored as a new target to treat obesity-related disorders. Unlike the previous studies, our work provides an assessment of mitochondrial oxygen consumption by cells in the course of complete 21-day lasting adipogenesis and uses for the differentiation stem cells derived from human adipose tissue.

Study limitations

In this study, we have used human adipose-derived stem cells to determine basic mitochondrial characteristics in the course of their differentiation into mature adipocytes. Unlike commonly used human bone marrow mesenchymal cells (Charbord 2010) they enable less invasive recovery from patients while maintaining the same phenotype and functional characteristics. However, full adipogenesis is time-consuming and expensive process associated with many technical problems, like increasing fragility of the cells and their difficult harvesting. Although expression of FABP4 confirmed successful differentiation and maturation of adipocytes (Baxa *et al.* 1989), final cells did not contain

a single lipid droplet typical for mature cells of white adipose tissue, but rather multiple lipid droplets resembling fat stores in the brite/beige adipocytes (Cedikova *et al.* 2016). In addition, mature cells lose viability early after the end of differentiation, which makes experiments with chronic exposure of these adipocytes to potentially harmful chemicals impossible. Nevertheless, they represent an excellent tool in research of adipogenesis from its very beginning (i.e. from the commitment of adipose-derived stem cells) in humans.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by the project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267, "Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)", awarded by the MEYS CR, financed from ERDF CZ, project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 "Fighting Infectious Diseases", awarded by the MEYS CR, financed from EFRR, Charles University Research Fund (Progres Q39), by the National Sustainability Program I (NPU) Nr. LO1503 provided by the MEYS CR, and the Specific Student Research Project No. 260394/2017 of the Charles University in Prague.

References

- BAXA CA, SHA RS, BUELT MK, SMITH AJ, MATARESE V, CHINANDER LL, BOUNDY KL, BERNLOHR DA: Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28: 8683-8690, 1989.
- BERRY R, JEFFREY E, RODEHEFFER MS: Weighing in on adipocyte precursors. *Cell Metab* 19: 8-20, 2014.
- BOULLAUD F, RICQUIER D, MORY G, THIBAUT J: Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J Biol Chem* 259: 11583-11586, 1984.
- CAI L, LUBITZ J, FLEGAL KM, PAMUK ER: The predicted effects of chronic obesity in middle age on medicare costs and mortality. *Med Care* 48: 510-517, 2010.
- CASTRO AVB, KOLKA CM, KIM SP, BERGMAN RN: Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arg Bras Endocrinol Metabol* 58: 600-609, 2014.
- CEDIKOVA M, KRIPNEROVA M, DVORAKOVA J, PITULE P, GRUNDMANOVA M, BABUSKA V, MULLEROVA D, KUNCOVA J: Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. *Stem Cells Int* 2016: 6067349, 2016.
- CHARBORD P: Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21: 1045-1056, 2010.

- CHEN Q, SHOU P, ZHENG C, JIANG M, CAO G, YANG Q, CAO J, XIE N, VELLETRI T, ZHANG X, XU C, ZHANG L, YANG H, HOU J, WANG Y, SHI Y: Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ* 23: 1128-1139, 2016.
- DEJMEK J, KOHOUTOVA M, KRIPNEROVA M, CEDIKOVA M, TUMA Z, BABUSKA V, BOLEK L, KUNCOVA J: Repeated exposure to hyperbaric hyperoxia affects mitochondrial functions of the lung fibroblasts. *Physiol Res* 67 (Suppl 4): S633-S643, 2018.
- DREHMER DL, DE AGUIAR AM, BRANDT AP, PETIZ L, CADENA SM, REBELATTO CK, BROFMAN PR, FILIPAK NETO F, DALLAGIOVANNA B, ABUD AP: Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. *Stem Cell Res* 17: 413-421, 2016.
- HOFMANN AD, BEYER M, KRAUSE-BUCHHOLZ U, WOBUS M, BORNHAUSER M, RODEL G: OXPHOS supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCs. *PLoS One* 7: e35160, 2012.
- KHACHO M, SLACK RS: Mitochondrial activity in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 49: 1-8, 2017.
- KUSMINSKI CM, SCHERER PE: Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23: 435-443, 2012.
- KUZNETSOV AV, STROBL D, RUTTMANN E, KONIGSRADNER A, MARGREITER R, GNAIGER E: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 305: 186-194, 2002.
- LARSEN S, NIELSEN J, HANSEN CN, NIELSEN LB, WIBRAND F, STRIDE N, SCHRODER HD, BOUSHEL R, HELGE JW, DELA F, HEY-MORGENSEN M: Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol (Lond)* 590: 3349-3360, 2012.
- LUAN G, LI G, MA X, JIN Y, HU N, LI J, WANG Z, WANG H: Dexamethasone-induced mitochondrial dysfunction and insulin resistance-study in 3T3-L1 adipocytes and mitochondria isolated from mouse liver. *Molecules* 24: E1982, 2019.
- LUNA-LUNA M, MEDINA-URRUTIA A, VARGAS-ALARCON G, COSS-ROVIROSA F, VARGAS-BARRON J, PEREZ-MENDEZ O: Adipose tissue in metabolic syndrome: onset and progression of atherosclerosis. *Arch Med Res* 46: 392-407, 2015.
- LUZ AL, KASSOTIS CD, STAPLETON HM, MEYER JN: The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR γ activation, in 3T3-L1 cells. *Toxicology* 393: 150-159, 2018.
- MISSION JF, MARSHALL NE, CAUGHEY AB: Pregnancy risks associated with obesity. *Obstet Gynecol Clin North Am* 42: 335-353, 2015.
- MORRISON S, MCGEE SL: 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte* 4: 295-302, 2015.
- MULLEROVA D, PESTA M, DVORAKOVA J, CEDIKOVA M, KULDA V, DVORAK P, BOUCHALOVA V, KRALICKOVA M, BABUSKA V, KUNCOVA J, LANGMAJEROVA J, MULLER L: Polychlorinated biphenyl 153 in lipid medium modulates differentiation of human adipocytes. *Physiol Res* 66: 653-662, 2017.
- PESTA D, GNAIGER E: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 810: 25-58, 2012.
- QIAO L, CHU K, WATTEZ JS, LEE S, GAO H, FENG GS, HAY WW, SHAO J: High-fat feeding reprograms maternal energy metabolism and induces long-term postpartum obesity in mice. *Int J Obes (Lond)* 43: 1747-1758, 2019.
- SADIE-VAN GH: Adipocyte biology: It is time to upgrade to a new model. *J Cell Physiol* 234: 2399-2425, 2019.
- SHEPHERD PR, GNUDI L, TOZZO E, YANG H, LEACH F, KAHN BB: Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 268: 22243-22246, 1993.
- SPIEGELMAN BM, FLIER JS: Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389, 1996.
- TANG QQ, LANE MD: Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81: 715-736, 2012.

-
- ZALATA AA, LAMMERTIJN N, CHRISTOPHE A, COMHAIRE FH: The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* 21: 289-294, 1998.
- ZHANG Y, MARSBOOM G, TOTH PT, REHMAN J: Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 8: e77077, 2013.
- ZIMMET P, ALBERTI KG, SHAW J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787, 2001.
-

Přehledová práce

Nové pohledy na význam rostlinných polyfenolů ve výživě

Doc. Ing. Zdeněk Zloch, CSc., Mgr. Iva Kladnická

Ústav hygieny a preventivní medicíny, LF UK, Plzeň

Abstrakt

Rostlinné polyfenoly, přírodní látky přítomné ve všech potravinách rostlinného původu, jsou předmětem celosvětově rostoucího zájmu badatelů v oblasti lidské výživy. Zásadní nové poznatky vyplývající z tohoto výzkumu doplňují, případně mění dosud tradovaný obraz složitých metabolických drah těchto látek v lidském organismu, avšak stále ještě neumožňují odhalit spolehlivě takové jejich biologické účinky, jež by vysvětlovaly předpokládaný preventivní vztah těchto látek k neinfekčním chronickým chorobám. Na druhé straně nesporným závěrem výzkumu, zejména epidemiologických studií, je potvrzení, že zdravá výživa a zdravé potraviny by měly zahrnovat pravidelný a dostatečný příjem vhodných typů polyfenolů. Protože jejich průměrný celkový příjem je u české populace malý, je žádoucí stimulovat u všech populačních skupin, zejména rizikových, zájem o potraviny bohaté na biologicky nejúčinnější podskupiny rostlinných polyfenolů, případně nabízet je v doplňcích potravy.

Úvod

Pozornost, která je v odborné veřejnosti věnována rostlinným polyfenolům, v posledním desetiletí exponenciálně stoupá. Svědčí o tom počet vědeckých publikací zaměřených na různé aspekty těchto přírodních látek. Zatímco do roku 1990 počet článků, věnovaných nejdříve chemickým strukturám a později metodám stanovení, úloze polyfenolů v senzorické kvalitě potravin a posléze jejich biologickým účinkům a dalšímu rozšiřování poznatků o jejich výskytu a o velikosti jejich příjmu, nepřekročil v úhrnu jednu tisícovku, v období následujícím až doposud je jich evidováno přes 90 tisíc [1]. Žádné jiné skupině přírodních látek v rostlinném materiálu není věnována podobná pozornost. Celkový počet vědeckých prací o flavonoidech např. převyšuje počet prací o vitamínech C a E, o karotenoidech a o selenu dohromady. Mění se také předmět studia a cíl vědeckého bádání a jeho výstupů; pro uplynulých 10 let je příznačné, že se pozornost soustřeďuje na látkovou přeměnu polyfenolů v lidském organismu, na povahu biologicky aktivních metabolitů, na důkaz existence a podmíněnosti jejich vlivu na zdraví a na hledání a ověřování možností využití potravin (popř. potravin doplněných polyfenoly) k upevňování zdraví a k účinné prevenci nemocí [2]. Pro tento obor nutričního výzkumu je typické, že důležitými prameny poznatků už nejsou jen výsledky epidemiologických studií (kterých je

nepřehledně mnoho), ale jejich metaanalýzy a metaanalýzy metaanalýz. Svou roli ostatně také hraje skutečnost, že rostlinné polyfenoly jsou nejpočetnější skupinou fytochemických látek (dosud bylo identifikováno přes 9 tisíc chemických individuí) a obsah polyfenolů převyšuje obsah vitaminů a esenciálních mikronutrientů. Jejich celkový denní příjem převyšuje u všežravých dospělých osob 1 g, u lidí vegetariánsky orientovaných a konzumujících větší dávky kávy a čaje, kakaových výrobků, piva a vína může dosahovat 3 a více g/den [3]. Téměř všechny tyto látky vykazují samy o sobě (a také potraviny, které je obsahují) v testech vysokou antioxidační aktivitu. Už starší zkušenosti ukazovaly, že s větším a pravidelným konzumem ovoce, zeleniny, luštěnin, výrobků z obilovin, čaje, kávy a vína se významně posiluje ochrana zdraví před neinfekčními degenerativními chorobami (kardiovaskulárními, nádorovými, neurodegenerativními, diabetem 2. typu aj.) a také naděje na dožití ve vyšším věku a v dobrém zdraví. Dnes je středem pozornosti příčina zdravotní prospěšnosti polyfenolů a mechanismus jejich účinku, který není zdaleka podmíněn pouze jejich antioxidačním charakterem [4].

V tomto sdělení stručně shrneme závěry, ke kterým studium různých aspektů výskytu polyfenolů v potravinách, různých stránek jejich biologické aktivity a prokazatelných účinků na zdraví lidí v období posledních přibližně 10 let dospělo. Naším cílem je také upozornit na omyly, které se v laické veřejnosti ohledně fenolových fytochemických látek vyskytují.

Současný stav znalostí o obsahu rostlinných polyfenolů v potravinách

Metodické problémy se stanovením obsahu polyfenolů v potravinách už byly uspokojivě vyřešeny. Velmi oblíbená, ale nároková na specifčnost a spolehlivost nevyhovující je metoda založená na reakci fenolové skupiny s molybdenanem v alkalickém roztoku (tzv. Folin-Ciocalteuova metoda), která se používá pouze k předběžnému a orientačnímu stanovení. Moderní metody jsou založeny na citlivých dělicích postupech s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je případně doplněna hmotnostní spektrometrickou identifikací. Od roku 2009 je k dispozici online databáze, obsahující hodnoty obsahu polyfenolů v potravinách, které byly staženy z 1 300 odbor-

Tabulka č. 1.

Příklad rostlinných zdrojů s nejvyššími obsahy polyfenolů

Potravina	Obsah polyfenolů	Typ polyfenolu
Kapary	655 mg/100 g	převažují flavonoly
Máta peprná	1490 mg/100 g	flavony
Sójová mouka odtučněná	477 mg/100 g	isoflavony
Bezinky	1316 mg/100 g	antokyanidiny
Černý rybíz	592 mg/100 g	antokyanidiny
Kakaový prášek	512 mg/100 g	flavanoly
Kaštiny jedlé	1215 mg/100 g	kyselina benzoová
Káva rozpustná	330 mg/l šálek	kyselina chlorogenová

Tabulka č. 2.

Žebříček velikosti denního příjmu polyfenolů

Stát	Denní příjem polyfenolů
Dánsko	1706 mg
Francie	1193 mg
Polsko	1092 mg
Finsko	863 mg
Španělsko	626 mg
Recko	664 mg
Brazílie	460 mg
Česká republika	426 mg

ných článků. Jinou velmi obsáhlou a stále široce využívanou databázi uveřejnili v roce 2010 Neveu a spol. [5]. Hodnoty obsahů polyfenolů v databázi byly získány laboratorními analýzami minimálně 10 vzorků každého druhu potraviny (získaných z různých světových oblastí) a byly použity paralelně čtyři různé analytické metody - spektrofotometrická s Folin-Ciocalteuovým činidlem a tři různé modifikace vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Je nutné ale respektovat skutečnost, že ani tak důkladným přístupem se nemohou získat univerzálně použitelné výsledky, protože obsah polyfenolů v každé potraviny rostlinného původu se může velmi podstatně lišit v závislosti na odrůdě, na klimatických podmínkách pěstování, na agrotechnických podmínkách a na mnoha dalších okolnostech. Uvádíme příklady rostlinných zdrojů s nejvyššími obsahy polyfenolů, viz Tabulka č. 1.

Na základě znalosti velikosti spotřeby jednotlivých druhů potravin se vypočítává průměrný denní příjem polyfenolů na 1 osobu. Tento údaj je v epidemiologických studiích a při každém jiném způsobu hodnocení vlivu potravních polyfenolů na zdraví velmi důležitý, avšak jeho validita je často zpochybňována, protože dosud nebyly vypracovány zcela spolehlivé individuální dotazníky o spotřebě potravin a databáze obsahů polyfenolů v potravinách je možné používat jen s vědomím jejich přibližnosti.

Z přehledu relevantních epidemiologických studií vyplývá tento žebříček velikosti denního příjmu polyfenolů, viz Tabulka č. 2.

Hlavními zdroji polyfenolů v naprosté většině zemí, kde byly hodnoceny, byla káva, čaj, ovoce (v pořadí

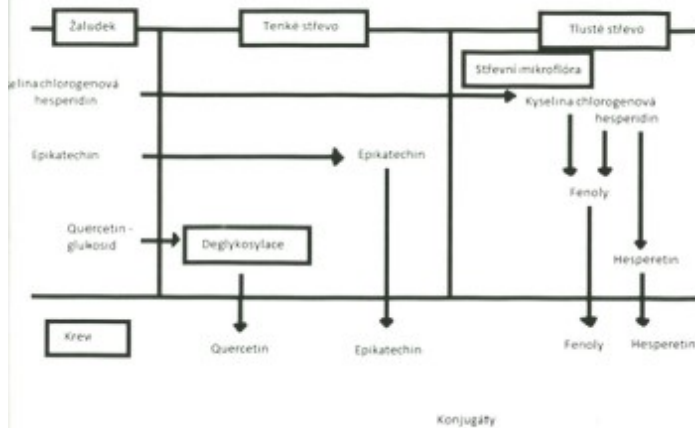
bobulové, jádrové a citrusové) a kakao, v České republice také obiloviny a pivo. Z jednotlivých skupin fenolových látek v Evropě převažují flavanoly (káva, kakao, čaj, jablka), flavanony (citrusy), kyseliny hydroxyskořicové (káva, bobulové ovoce), flavonoly (cibule, jablka, čaj) a antokyanidiny (barevné ovoce). V České republice se podle naší studie uplatňují nejvíce hydroxyskořicové kyseliny (z 30%) a dále flavony, flavanoly a antokyanidiny (dohromady ze 42%) [6]. Ve všech úvahách o velikosti a struktuře příjmu rostlinných polyfenolů se dosud vědomě opomíjí užívání polyfenolových doplňků potravy a funkčních potravin s dominantním obsahem těchto fytochemických látek. Není také podle našeho názoru dosud vědecky zhodnocen skutečný dopad těchto přípravků na zdraví lidí.

Biologická přístupnost a metabolismus polyfenolů zásadním způsobem limitují jejich biologickou aktivitu

Zcela zásadní otázkou zdravotní prospěšnosti rostlinných polyfenolů je míra a povaha jejich využití v lidském organismu. Polyfenoly jsou ve svých rostlinných zdrojích uloženy ve vnitrobuněčném (často ve vakuolách) i v mimobuněčném prostředí. Vždy jsou doprovázeny velkým množstvím organických látek, často makromolekulární povahy, s nimiž jsou navázány vazbami. Charakter této tzv. matrice je rozhodující pro míru rozpustnosti, chemického štěpení a velikosti vstřebání polyfenolů v trávicím ústrojí. Tím je také podmíněna velikost a povaha jejich biologického účinku. Základem matrice jsou různé polysacharidy nebo heteropolysacharidy, bílkoviny a tuky, často se jedná o makromolekuly, které se zahrnují do kategorie vlákniny potravy (polymerní polyfenoly, např. proantokyaniny nebo polymerní katechiny se přímo s vlákninou ztotožňují). V odborné literatuře se tak pojednává o potenciálu „bioaccessibility“, což zahrnuje především způsobilost polyfenolů být předmětem trávení, a „bioavailability“, která se týká procesu vstřebání, metabolismu a transportu polyfenolů a jejich štěpných produktů k cílovým tkáním [7]. Na tyto aspekty je v poslední době kladen velký důraz a jsou podrobovány důkladnému studiu, neboť jen jejich znalost otevírá cestu k dalšímu ověřování skutečné biologické aktivity polyfenolů a jejich ovlivňování zdraví [8]. V této oblasti výzkumu bylo v posledním desetiletí shromážděno nejvíce cenných, často překvapujících poznatků.

Využitelnost polyfenolů přítomných v rostlinné potravě je podmíněna nejen povahou matrice, na kterou jsou v potravě vázány, ale také způsobem kulinářské úpravy, zejména tepelnými zákroky, které mohou trávení polyfenolů usnadnit, nebo naopak snížit nebo zcela znemožnit. Trávení polyfenolů může probíhat už v žaludku (žaludečními amylasami) a v největší míře v celé délce tenkého střeva. Zde se účinkem pankreatických a intestinálních amylas a glykosidas štěpí především vazby mezi aglykony a sacharidy (glykosidy jsou prakticky vylučovací formou jednoduchých polyfenolů v potravě).

Obrázek 1.
Metabolická cesta příjmu, absorpce a metabolismu polyfenolů [13]



Toto schéma nově zohledňuje a osvětluje procesy probíhající v tlustém střevu.

zjištěno, že polyfenoly se mohou vázat na bílkoviny trávicích enzymů a tím jednak inhibovat jejich aktivitu a jednak snižovat svou antioxidační účinnost. Na druhé straně se určitá část polyfenolů vstřebává v původní nebo málo pozměněné podobě. Tyto zbytky jsou v játrech podrobeny biotransformacím 1. typu (hydroxylace, oxygenace aj.) a následně biotransformacím 2. typu, zejména methylací a O-methylací, sulfataci a glykosidické vazbě s kyselinou D-glukuronovou. Uronidglukosidy, sulfáty a methylderiváty polyfenolů a jejich fragmentů jsou běžně identifikovány v různých tkáních a v moči, ovšem obvykle v menší než mikromolární koncentraci. Polyfenoly jsou tak pravděpodobně zčásti v těle katabolizovány jako xenobiotika, látky tělu cizí (týká se benzenových cyklů). Zásadním

V posledních letech bylo opakovaně prokázáno, že toto štěpení a také rozklad oligomerních a polymerních forem polyfenolů (taniny, leukoantokyanidiny) probíhají v tenkém střevu člověka jen v omezené míře nebo neprobíhají vůbec a nestrávené zbytky jsou přenášeny do tlustého střeva. Zde se stávají výživovým substrátem pro velké počty a početné druhy bakterií, které napadají různé části molekul polyfenolů včetně benzenových jader. Potvrzuje se, že i tyto metabolity se mohou stěnou tlustého střeva vstřebat a vstupovat do systémového oběhu, část z nich (mnohdy podstatná) se z těla vyloučí. V přítomné době se realizuje mnoho studií, které in vitro kombinují různé podmínky simulující prostředí trávicího ústrojí a pátrají po osudu polyfenolových struktur. Příkladem jsou modely obsahující kyselinu chlorovodíkovou, pepsin nebo mírně zásadité prostředí a žluč. Oblíbená je aplikace kultur nádorových buněk ze stěny tlustého střeva, pomocí nichž se studuje průběh absorpce polyfenolů a produktů jejich trávení. Bylo tak např. zjištěno, že jablečné polyfenoly se u člověka štěpí na aglykony a sacharidy už v žaludku, a to z 65 %, zbytek se rozkládá v tenkém střevu. Po aplikaci antokyanidinů značkových radioisotopem ¹⁴C byly nalezeny značkové metabolity (typu acetyl- nebo valeryl- fenolů a fenylacetové kyseliny aj.) v krvi, v moči a ve stolici pokusných osob a také v jejich dechu (12 % ¹⁴C z původní dávky), což naznačuje hluboký strukturální rozklad polyfenolů ve střevu a jejich velký podíl, který nebyl v organismu využit. Velká část přírodních fenolových látek přijímaných potravou přechází až v 90 % podílu do tlustého střeva. Koncentrace polyfenolů a jejich metabolitů vzniklých v tenkém střevu a ihned vstřebaných dosahuje po nasycení v krvi hodnoty přibližně 1 μmol na litr, zatímco koncentrace metabolitů vzniklých v tlustém střevu bývá v krvi 10 až 100 krát větší. Bylo také opakovaně

nová generace dotykových terminálů

Nabízíme kompletní stravovací programy pro školní jídelny, internetové objednávky.

Strávníci evidence, filtrování, tisky, internet, banky, vyúčtování, pokladna, ...

Skladování jídelniček, normování, žádanky, receptury, kalkulače, spotřební koš, sledování alergenů, ...

školení a servis po celém území ČR

<p>Havlíčková 46 586 01 Jihlava Tel.: 567 300 410 567 586 104 Mobil: 603 867 521 E-mail: jihlava@z-ware.cz</p>	<p>Rípská 20a 627 00 Brno Tel.: 515 919 840 515 919 841 Mobil: 603 867 521 E-mail: walter@z-ware.cz</p>
---	--

www.z-ware.cz

a poměrně novým poznatkem tak je skutečnost, že reálné využití rostlinných polyfenolů v těle člověka je velmi omezené a je velmi závislé na matrici, na kterou je vázáno, na způsobu tepelné úpravy potravy a zejména na složení střevní bakteriální mikrobioty [9, 10]. Stručné schéma znázorňující hlavní metabolické dráhy polyfenolů v lidském organismu je znázorněno na obr. 1.

Biologická aktivita polyfenolů je velmi vágní a její poznání je možné jen pomocí klinických studií

O polyfenolech se již po dlouhou dobu soudí, že mají příznivý účinek na zdraví. Tento předpoklad je z dnešního hlediska oprávněný pravděpodobně ve smyslu posilování prevence některých chorob. Jestliže větší spotřeba ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin, popřípadě také čaje, kávy a kakaových produktů jsou asociovány s nižší incidencí neinfekčních chronických nemocí, považuje se za důvodné, že důležitým příznivým faktorem je dostatečný příjem fytochemických látek typu rostlinných polyfenolů. V přítomné době se volá po rozšíření klinického výzkumu těchto látek (dosud se vychází převážně z výsledků epidemiologických studií a experimentů s pokusnými zvířaty), které by umožnily zdokonalit poznání příčinných souvislostí a mechanismů biologických účinků polyfenolů. Přetrvávajícím nedostatkem je převládající zájem výzkumníků o flavonoidy, které tvoří jen část širokého spektra polyfenolů v naší potravě. Ve skutečnosti více než polovinu polyfenolů představují v evropské populaci deriváty kyseliny benzoové a hydroxyskořicové. V posledních několika letech byly publikovány výsledky studií na buněčných a tkáňových kulturách a pokusů s lidskými dobrovolníky, jejichž výsledky dovolují formulovat hypotézy o povaze biologických účinků polyfenolů a jejich metabolitů na molekulárně chemické úrovni [11].

Tyto práce se zaměřují na důležité a perspektivní stránky problematiky účinků polyfenolů na zdraví: jedná se o jejich potenciální účast v pochodech karcinogeneze, respektive buněčné proliferace a tkáňové diferenciace a programované smrti, ovlivnění sekrece a účinků inzulínu a vliv na postprandiální glykémii, vliv na apetit člověka a na jeho energetický metabolismus ve vztahu k udržení nebo úpravě tělesné hmotnosti, vliv na tukový metabolismus (včetně zvýšeného obrátu cholesterolu a inhibice lipas), vliv na snížení napětí v cévách a na krevní tlak a vliv na neurodegenerativní procesy. V souvislosti s tím se stále věnuje pozornost, i když v omezenější míře, antioxidantní aktivitě polyfenolů ve smyslu žádoucí, ochranné funkce před škodlivými účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS, NOS). Přehled dosud získaných převážně dílčích výsledků je velmi široký a při značném zjednodušení jej lze shrnout konstatováním, že některé polyfenoly (zejména flavanoly/katechiny, flavonoly, resveratrol, antokyaniny) pravděpodobně za určitých podmínek

stimulují expresi genů kódujících antioxidantní enzymy a cytoprotektivní proteiny; mechanismus této stimulace je založen na podpoře fosforylace serinových skupin na oxidačně redukční regulaci cysteinových skupin aktivních bílkovin a peptidů (enzymových, transkripčních faktorů, cytokinů aj.) a v důsledku toho na modulaci buněčných signálních přenosů [12].

Velmi nesnadným, ale důležitým úkolem je vymezení těch druhů polyfenolových sloučenin, u kterých se taková biologická aktivita předpokládá a na něž by se zaměřil další intenzivní výzkum.

V přítomné době se za zdravotně velmi prospěšné považují přírodní látky přítomné v čaji zeleném, černém i v jeho ostatních variantách, v kávě (není-li kontraindikována, doporučuje se 3 a více šálků denně), v kakaových výrobcích, v bobulovém ovoci, zejména v borůvkách, hrozních (červených a také v červeném víně), dále v jablkách, citrusech, luštěninách, zázvoru a v odtučněné sójové mouce.

Je účelné užívání funkčních potravin obohacených polyfenoly nebo polyfenolových doplňků?

Výběr potravin, které jsou zdrojem „zdravých“ polyfenolů, je poměrně snadný. Naše obchody disponují širokým sortimentem potravin, které nemusí být pouhým prostředkem k nasycení, ale mohou pozitivně ovlivňovat zdraví a jsou pro velkou část populace cenově dostupné. Jedná se především o potraviny rostlinného původu.

Přesto jsme zaznamenali v ČR podprůměrný příjem rostlinných polyfenolů [6]. V zájmu podpory veřejného zdraví je proto žádoucí stimulovat větší zájem o zdroje polyfenolů, ale nabízí se také možnost užívání speciálních doplňků potravy a přípravy funkčních potravin obohacených těmito přírodními látkami. Tato praxe je ve světě dnes běžná, globální trh s polyfenolovými preparáty získává téměř 1 miliardu US dolarů ročně a nepřetržitě roste. V západní Evropě a v USA se nejvíce prodávají extrakty z bohatých zdrojů, jako je zelený čaj nebo odtučněná sójová mouka.

Cílové skupiny, k nimž by měla nabídka polyfenolových zdrojů směřovat, jsou lidé ohrožení chronickým neinfekčním onemocněním, jako jsou srdečně cévní, nádorové a neurodegenerativní nemoci a diabetes 2. typu, a všeobecně všichni senioři. Je možné vycházet ze skutečnosti, že polyfenoly jsou málo toxické, mnohdy ale mají zhoršené senzorké a fyzikálně chemické vlastnosti, což lze kompenzovat ochucením, emulgací apod. úpravami. Protože mají velmi rychlý metabolický obrát, měly by se konzumovat pravidelně v krátkých časových intervalech, pokud možno společně s běžnou potravou. Za zmínku stojí skutečnost, že velikost příjmu potravy rostlinného původu a s ním také rostlinných polyfenolů lze kontrolovat a testovat pomocí jednoduché semikvantitativní analýzy moči. Na našem pracovišti jsme úspěšně vyzkoušeli rychlý a jednoduchý test na celkový obsah polyfenolů a jejich metabolitů založený reakcí s Folin-Ciocalteuovým

činnidlem (test činnidlem na fenolové látky), na obsah kyseliny askorbové (titračně s 2,6-dichlorfenolindofenolem, indikuje velikost konzumu ovoce a zeleniny) a na celkovou antioxidační kapacitu (např. metodou FRAP s železitou solí a ferrikyanidem draselným, odráží přítomnost dalších antioxidantů).

Závěr

Velký počet epidemiologických studií uskutečněných v posledním desetiletí prokazuje nesporné zdravotně prospěšné účinky rostlinných polyfenolů, které se vyskytují všudypřítomně v potravinách rostlinného původu. Platnost tohoto zjištění neodporuje skutečnosti, že polyfenoly jsou v lidském organismu využity jen z malé části a jejich metabolismus je podstatně ovlivněn bakteriálním osídlením v tlustém střevu, které je interindividuálně značně rozdílné. Navíc struktura fenolových metabolitů, které jsou biologicky aktivní, ani molekulárně chemický mechanismus jejich účinku nebyl dosud spolehlivě objasněn. Považuje se za velmi pravděpodobné, že biologicky nejaktivnější typy polyfenolů jsou flavany, flavanoly (katechiny) a flavonoly, jejichž hlavními potravinými zdroji jsou čaj zelený i černý, káva, kakao, červené hrozny a víno a intenzivně barevné bobulové ovoce. V české populaci je příjem těchto látek nedostatečný. Zlepšení situace lze dosáhnout změnou spotřebního koše potravin (ve prospěch zdrojů flavonoidů) a nabídkou polyfenolových doplňků potravin.

Tato práce vznikla za podpory projektu „VaV inteligentních komponent pokročilých technologií pro plzeňskou metropolitní oblast (InteCom)“ reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267 financovaného z EFRR.

The work was supported from ERDF under project „Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)“ No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267.

Literatura

- Perez-Vizcaino F, Fraga CG (2018) Research trends in flavonoids and health. Arch. Biochem. Biophys. 646, 107–112.
- Mrduljš N, Krešič G, Bilušić T (2017) Polyphenols: Food sources and health benefits. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68862>.
- Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R (2017) Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 20, 512–521.
- Williamson G (2017) The role of polyphenols in modern nutrition. Nutr. Bull. 42, 226–235.
- Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, et al. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database – the Journal of biological database and curation 10.1093/database/baq0024.
- Zloch Z, Sedláček P, Langmajerová J, Müllerová D (2018) Intake and profile of plant polyphenols in the diet of the Czech population. Pol. J. Food Nutr. Sci. 68(1), 57–62. F.
- Metere A, Giacomelli L (2017) Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 21, 5850–5858.
- Rodriguez GR, Blancas-Benítez FJ, Wall-Medrano A et al. (2017) Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds from tropical fruits. Fruit Veget. Phytochem: Chem. Hum. Hlth, 2nd Ed., 8, 155–162.
- Almeida AF, Borge GIA, Piskula M et al. (2018) Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. Compreh. Rev. Food Sci. Food Saf. 17, 714–729.
- Wang T-Y, Li Q, Bi K-S (2018) Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian J. Pharmaceut. Sci. 13, 12–23.
- Wilson DW, Nash P, Buttar HS et al. (2017) The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older persons: An overview. Antioxid. 6(81), 1–20.
- Ghorbani A (2017) Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. Biomed. Pharmacother. 96, 305–312.
- Williamson, G (2017) The role of polyphenols in modern nutrition. Nutrition Bulletin [online]. 42(3), 226–235.

Abstract

Plant polyphenols are natural substances present in foods of plant origin. They are the subject of worldwide growing interest in human nutrition researchers. The fundamental new knowledge it follow that this research complement or change the imagine of the metabolit pathways of these substances in the human body, but still do not allow them to reliably detect their biological effects that would explain their predicted relationship to non-infectious chronic diseases. On the other side, the indisputable conclusion of research, especially epidemiological studies, is the confirmation that the healthy nutrition and healthy food should include regular and sufficient intake of suitable types of polyphenols. Because polyphenols average total intake for Czech population is small, it is desirable to stimulate interest in food rich in the most biological effective subgroups of plant polyphenols or offer them in food supplements for all population groups, especially vulnerable group.