

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

Xenobiotika v potravinách a jejich vliv na lidský organismus

Xenobiotics in food and their effects on the human health

Mgr. Iva Kladnická

Plzeň 2023

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studijního programu Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie na Ústav hygieny a preventivní medicíny LF UK v Plzni.

Uchazeč: Mgr. Iva Kladnická,
Ústav hygieny a preventivní medicíny LF UK v Plzni

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Petra Pazdiora, CSc.
Ústav epidemiologie LF UK v Plzni

Školitel: prof. MUDr. Dana Müllerová, Ph.D.,
Ústav hygieny a preventivní medicíny LF UK v Plzni

Oponenti: prof. MUDr. Bc. Zuzana Derflerová Brázdová, DrSc.
Ústav veřejného zdraví Masarykova univerzita v Brně

Prof. MUDr. Eva Králíková, CSc.
Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu
Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie

se koná dne: v: hod.

Místo obhajoby:

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, alej Svobody 1655/76, Plzeň.

Obsah

1	Úvod	6
2	Hypotéza a cíle práce	8
3	Materiál a metody	9
4	Výsledky studie	14
5	Diskuze	23
6	Závěr	26
7	Použitá literatura	27
8	Přehled publikační činnosti autora	34

Abstrakt

Jednou z cest expozice lidského organismu cizorodým látkám, xenobiotikům, 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

(Xenobiotics in food and their effects on the human organism)

One of the exposure pathways to xenobiotics in humans is food intake. Most of 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 the 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 obesity-related dysfunctional and inflamed adipose tissue 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 antioxidative 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 the 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 of 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 an 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 the 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

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.

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 látce zevně exponován [Patočka 2003].

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 obezogenním 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 inzulín), thyreostatik, dopaminergních blokátorů, betablokátorů, tricyklických antidepresiv, atypických

antipsychotik, antiepileptik, neuropeptidů a euronik gastrointestinálního traktu [Deon 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.

2 Hypotéza a cíle práce

Tato studie se zaměřila na vliv xenobiotik na lidský organismus. Navazujeme na studie, které obecně ukázaly spojitost mezi expozicí xenobiotikům, a to konkrétně obezogenům, 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, 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 jeho 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 zkusisní roli při přibírání na váze v důsledku vývojového programování kontroly tukové tkáně, nutričně nevyváženého příjmu stravy a metabolismu [Janesick a Blumberg 2016].

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-dichlorethylendichlorodipenyldichloroethylen (*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 μ M a 10 μ M.

3 Materiál a metody

Buněčná kultura a diferenciacie

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% konfluencie 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% konfluencie 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].

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 $100 \mu\text{l}$ na 1 propláchnutou jamku 96 well plate a roztok se nechal působit 15 minut. Oplach byl prováděn ve fyziologickém roztoku pufovaném 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).

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) [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 redukci 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 mikropate 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. 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.

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 pufru. Extrakt (100 µl) byl přenesen do 96 jamkové destičky. Absorbance byla měřena při 490 nm pomocí mikropate 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 blokáci 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 kyselině 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-kožím 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 sklička byla omyta, umístěna na mikroskopická sklička 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.

Kvalitativní a kvantitativní analýza mitochondrií

1. Barvení fluorescenční sondou

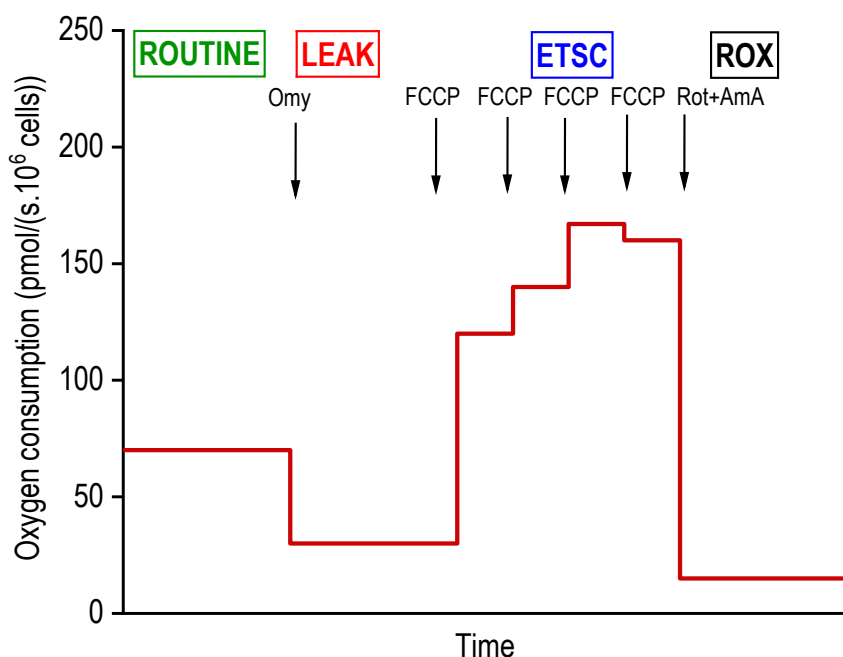
Fluorescenční sondy, MitoTrackerTM Red CMXRos a činidlo NucBlue[®] Live ReadyProbes[®] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zobrazují mitochondrie a jádra. Označení mitochondrií se provádí inkubováním buněk s MitoTrackerTM, který pasivně difunduje přes plazmatickou membránu a hromadí se v aktivních mitochondriích. 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 diferenciaci (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 diferenciacního 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 1 - 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 10^6 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 μ M) při 37 °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 μ l o koncentraci 200 μ M), který byl přidán k buněčné suspenzi (1 ml) a buňky byly inkubovány při 37 °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 μ l PBS a ihned měřena na průtokovém cytometru. Intenzita poměru

červené/zelené fluorescence byla stanovena pro hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu.

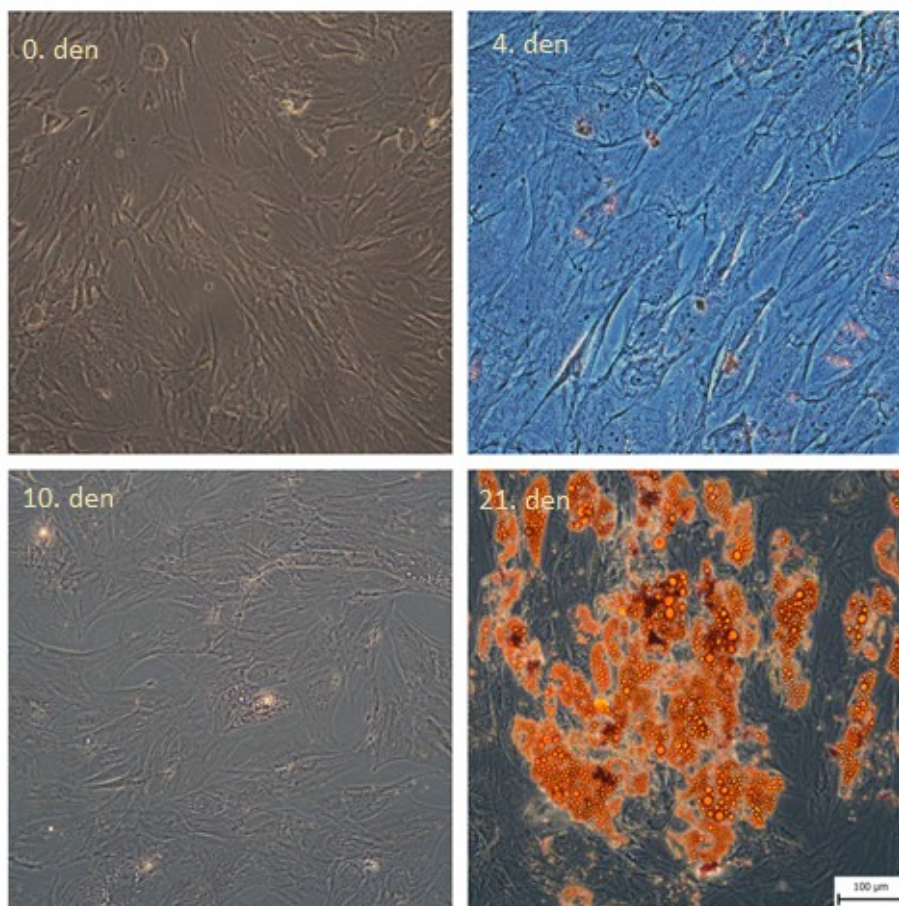
Analýza dat a statistika

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 logaritmicky 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.

4 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 2. 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.



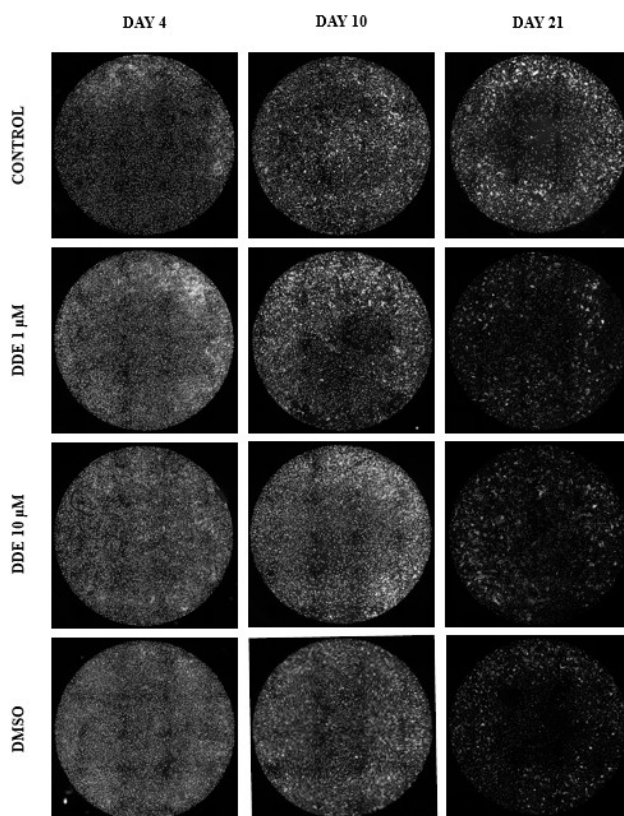
Obrázek 2 - Neovlivněné lidské mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (hADMSC's) během adipogeneze

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 diferenciac (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 diferenciac.

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 3 - Proliferace ovlivněných buněk během adipogeneze

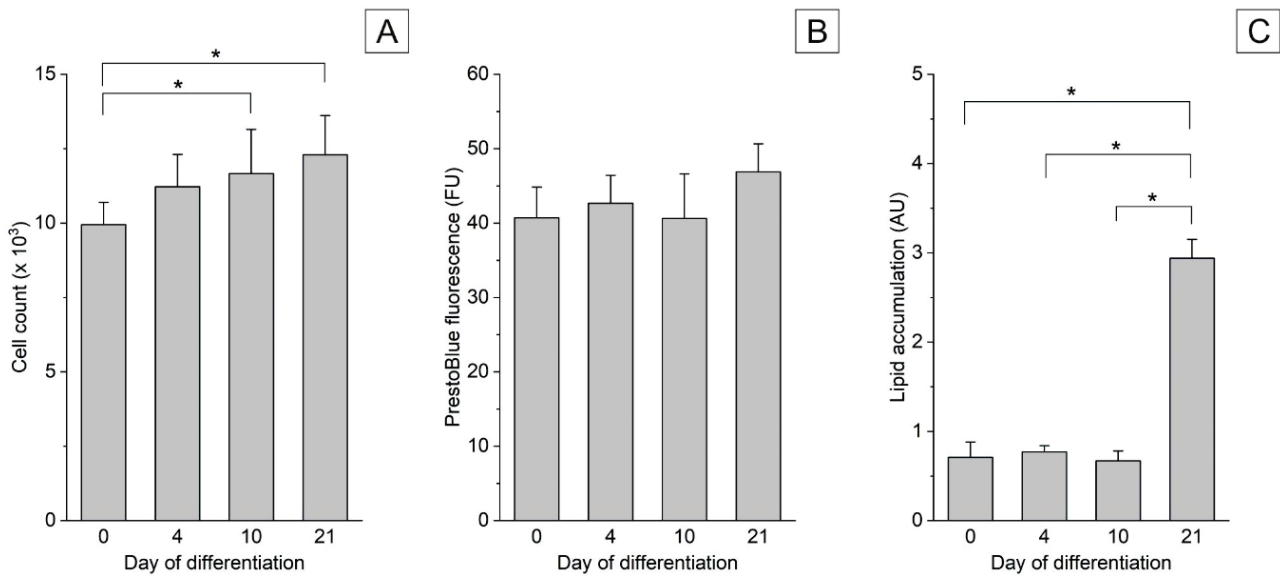
Legenda: Mikroskopická vizualizace a příklad množství jader v jednotlivých prostředích pomocí Olympus IX83 (Olympus, Tokio, Japonsko) vybaveného systémem VisiScope Live Cell Imagine při 100x zvětšení

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 diferenciace nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny.

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.



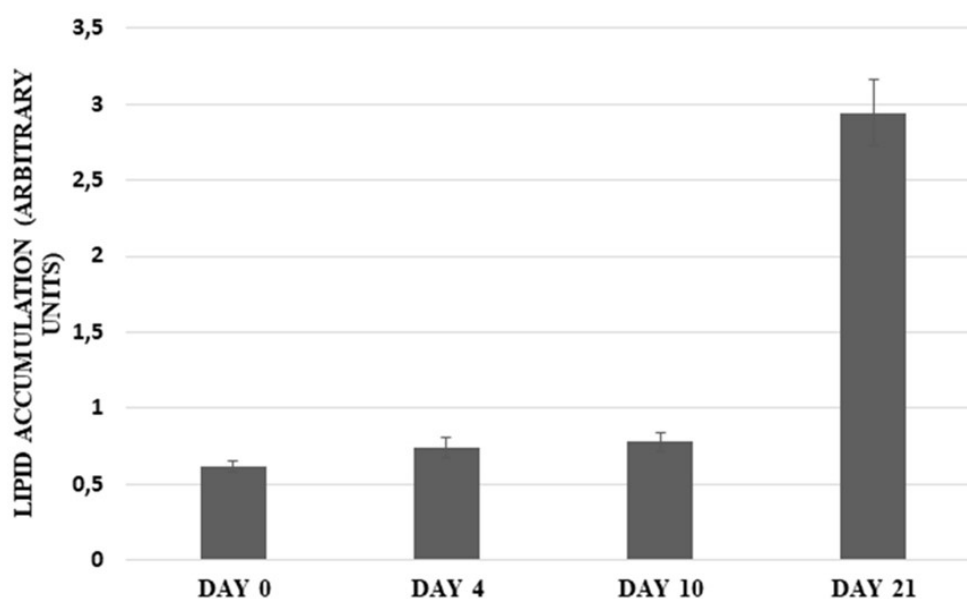
Obrázek 4 - Neovlivněná buněčná proliferace, životaschopnost a akumulace tuků v 0., 4., 10. a 21. den adipogeneze [Kladnická et al. 2019]

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 diference 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 diference nebyl pozorován zvýšený obsah tuku v buňkách do dne 10, viz obrázek 5. 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.



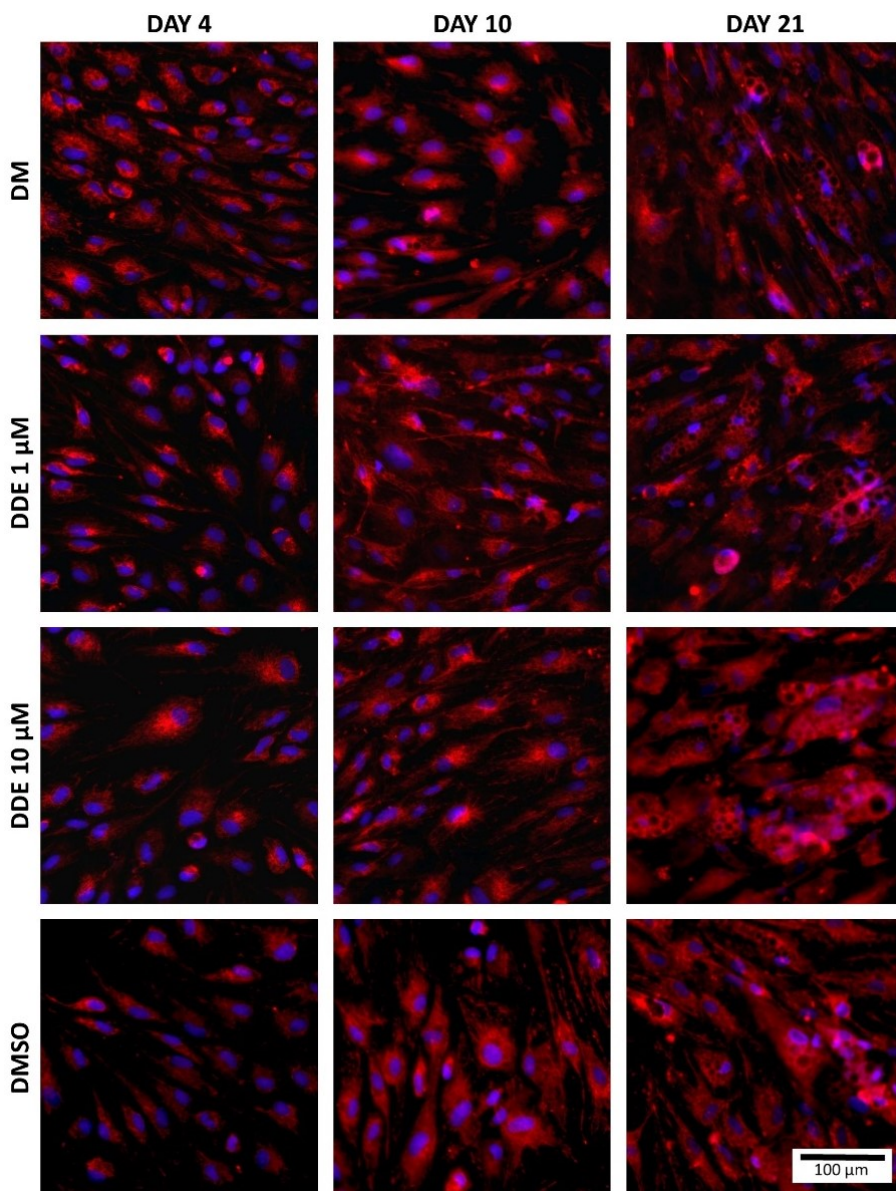
Obrázek 5 - Standardní ukládání lipidů z mezenchymálních kmenových buněk do zralého adipocytu ve 21. dnu

Kvalitativní a kvantitativní analýza mitochondrií

1. Barvení fluorescenční sondou

K vizualizaci mitochondrií a jader bylo použito činidlo MitoTrackerTM RedCMXRos a NucBlueTM Live ReadyProbes Reagent (obě Molecular Probes, Eugene, OR, USA). MitoTrackerTM pasivně přechází do mitochondrií a hromadí se zde. NucBlueTM 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 diferenciaci adipocytů došlo ke zvětšení objemu mitochondriálních sítí. Tyto údaje korespondovaly s výsledky stanovení aktivity citrát syntázy. Na konci diferenciaci byla aktivita citrát syntázy $92,7 \pm 33,5$ mIU/10⁶ buněk a byla významně vyšší, než v den 4 ($17,9 \pm 4,5$ mIU/10⁶ buněk). Tato data naznačují zvyšující se množství mitochondrií během diferenciaci.



Obrázek 6 - Vizualizace ovlivněných a neovlivněných jader a mitochondrií během adipogeneze [Kladnicka et al. 2021]

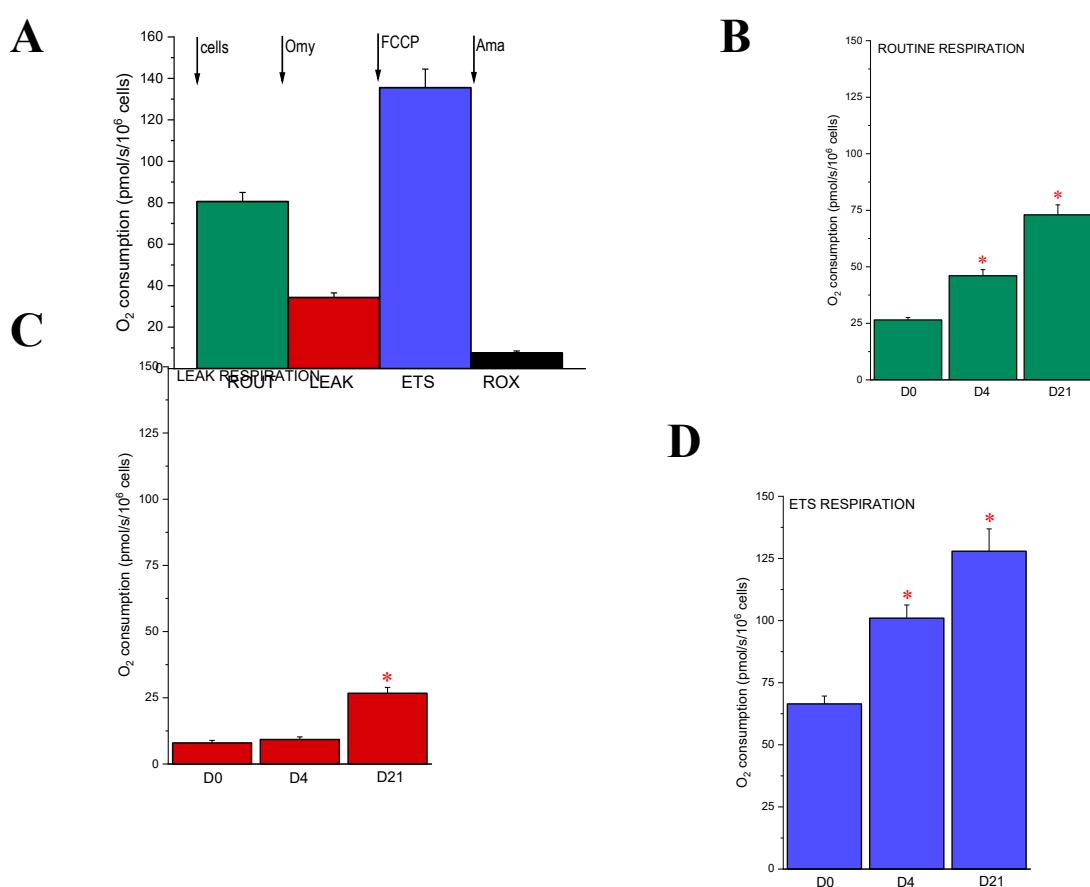
Legenda: K vizualizaci mitochondrií a jader byl použit MitoTracker™ RedCMXRos a NucBlue™ Live ReadyProbes Reagent. Mitochondrie vizualizovány červeně a jádra modře.

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 7A). 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 7B

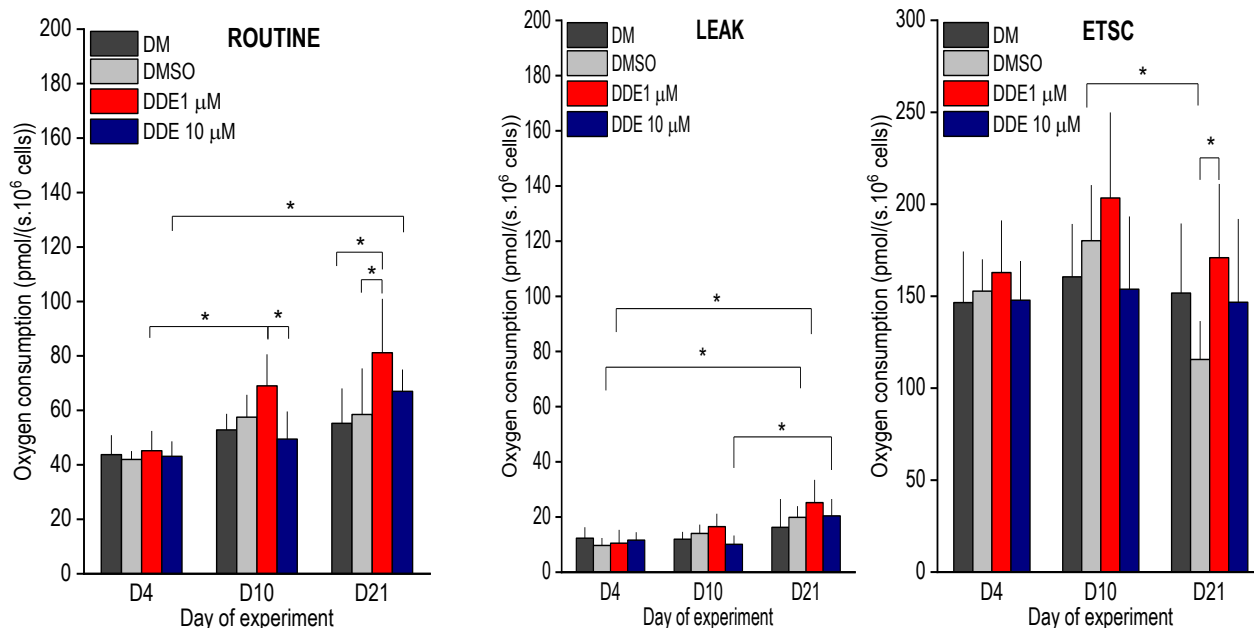
Ve stavu LEAK, tj. spotřebě kyslíku po inhibici syntézy ATP oligomycinem, postupně rostl ode dne 4 do dne 21. U DDE 10 μM adipocytů, byla respirace ve stavu LEAK velmi podobná ve dnech 4 a 10 ($11,6 \pm 2,9$ a $10,1 \pm 3,2$ pmol/s $\cdot 10^6$ buněk) a poté vzrostla a dosáhla statisticky signifikantního rozdílu mezi dny 10 a 21. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi ovlivněnými buňkami 4., 10. a 21. den experimentu (Obrázek 7C). 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 7D) [Kladnicka et al. 2021].



Obrázek 7 - 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 diferenciacce (den 4 a 21) ve stavech ROUTINE, LEAK a ETS.

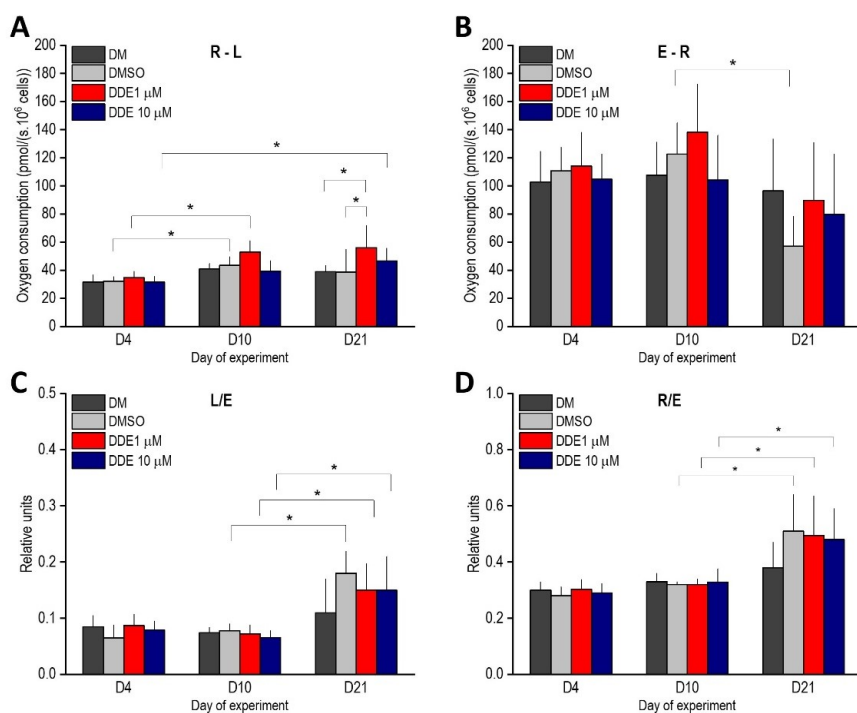
D = den; ROUTINE (ROUT) = rutinní respirace; LEAK = oligomycinem navozený stav LEAK nutný k udržení mitochondriálního membránového potenciálu; ETS = rozpráhovačem stimulovaná respirace, reflektuje maximální kapacitu elektron-transportního systému; ROX = stav reziduální spotřeby kyslíku po inhibici komplexu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



Obrázek 8 - 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 médium 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 (Dvojcenná 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 rozpřažení 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 rozpřažení 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 9) [Kladnicka et al. 2021].



Obrázek 9 - 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).

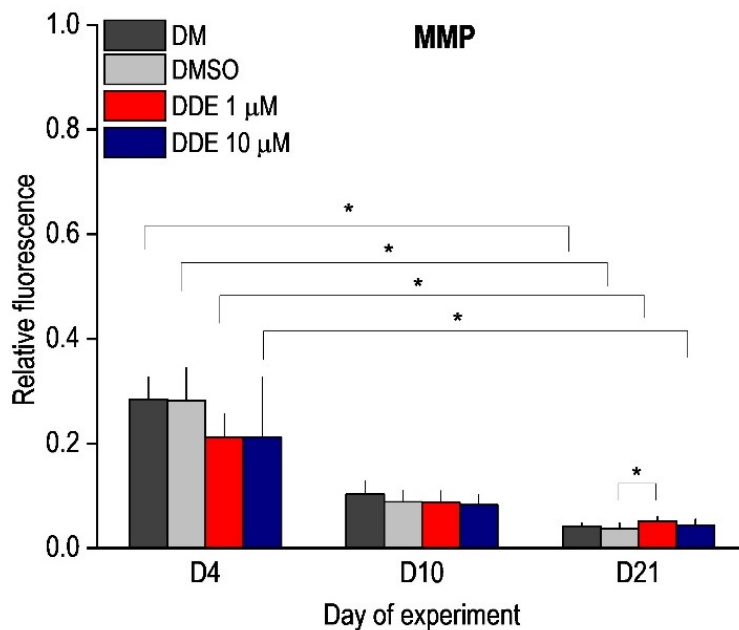
3. Aktivita citrát syntázy

Aktivita citrát syntázy se pohybovala mezi $10,61 \pm 5,26$ a $18,32 \pm 4,74$ mIU/10⁶ 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 diferenciaci 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 diferenciaci

bylo zvýšení poměru červená/zelená ve srovnání s médiem obsahujícím samotné DMSO (obrázek 10).



Obrázek 10 - 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

5 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 expozic, nižšími koncentracemi použitého polutantu, kontinuálním působením DDE na celý proces diferenciaci až do stádia maturace a typem studovaných buněk.

Priměřená 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 adaptaci 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].

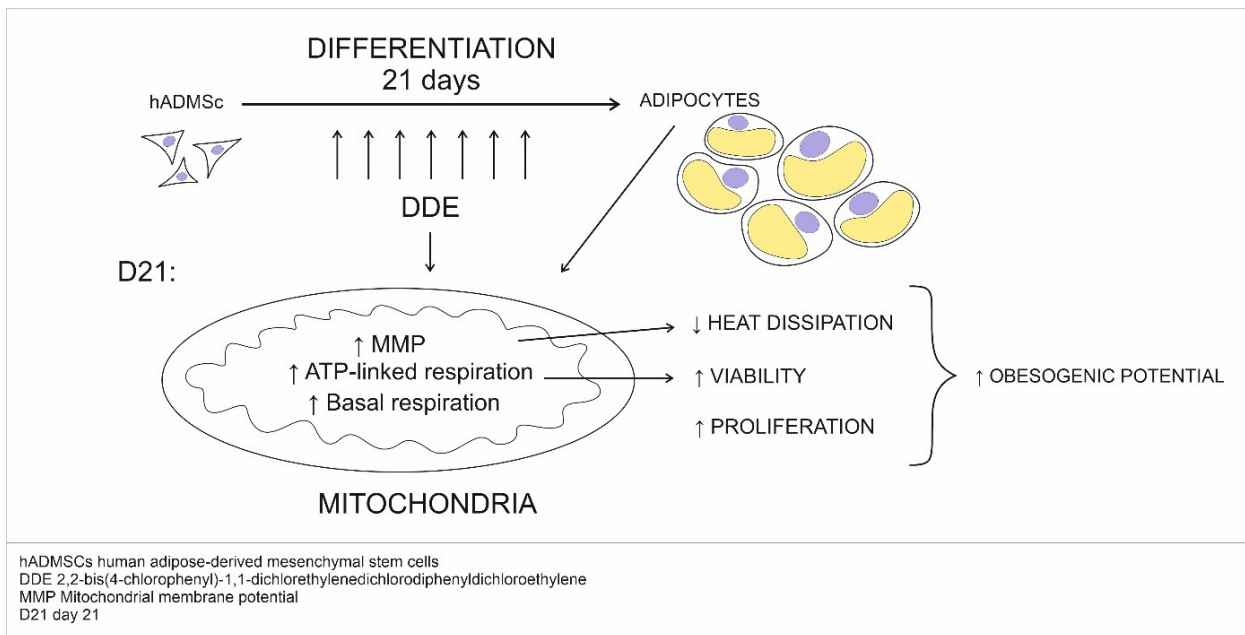
Podle nedávné studie by narušení termogeneze u adipocytů vystavených DDT mohlo být způsobeno cílením na mechanismy mimo tukovou tkáň bez nutnosti ovlivnění exprese uncouplig proteinů [vonderEmbse et al. 2021]. V naší studii musela LEAK respirace kompenzovat únik protonů, elektronů a cyklování kationtů, 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 diferenciacního 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 saturevaným 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 11 - Vizualizace průběhu pokusu a předpokládaný vliv zjištěných poznatků

6 Závěr

Obezita je v posledních 40 letech celosvětovou pandemií. Jedná se o chronické relapsující onemocnění, které je charakterizované zmnouženou 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 nových poznatků 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 diferenciaci 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 obezogení potenciál sníženou produkcí tepla, zvýšenou schopností proliferace a viability adipocytu. Chronická expozice vyšší koncentrací polutantu během diferenciaci adipocytu naopak diferenciacní proces zpomalovala. Tyto experimenty prokázaly schopnost chronické expozice zasahovat v průběhu adipocytární diferenciaci do fyziologického procesu adipogeneze, a to v závislosti na dávce polutantu.

7 Použitá literatura

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

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

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

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

BÖHM, Anja, Michaela KEUPER, Tobias MEILE, Marty ZDICHAVSKY, Andreas FRITSCHÉ, 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HIRABARA, Sandro M., Rui CURI a Pierre MAECHLER, 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

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

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

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

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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- KHANNA, Shally, NarendraNath SINGH a Vr BRAVE, 2010. Natural dyes versus lysochrome dyes in cheiloscropy: 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
- 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
- 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
- KLADNICKÁ, I., M. ČEDÍKOVÁ, M. KRIPNEROVÁ, J. DVOŘÁKOVÁ, M. KOHOUTOVÁ, Z. TŮMA, D. MÜLLEROVÁ a J. KUNCOVÁ, 2019. Mitochondrial Respiration of Adipocytes Differentiating From Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Adipose Tissue. *Physiological Research* [online]. S287–S296 [vid. 2021-03-05]. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934353
- 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
- KLADNICKA, Iva, Miroslava CEDIKOVA, Jan JEDLICKA, Michaela KOHOUTOVA, Ludek MULLER, Iveta PLAVINOVA, Michaela KRIPNEROVA, Monika BLUDOVSKA, Jitka KUNCOVA 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

KNEJZLIK, Zdeněk, Jan KÁŠ a Tomáš RUMML, [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>

KUZNETSOV, Andrey V., Daniela STROBL, Elfriede RUTTMANN, Alfred KÖNIGSRÄINER, 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

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

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

LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR, Martin WEHLING, Maxmilián WENKE a Elfrída MÜHLBACHOVÁ, 2004. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0836-2.

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

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

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

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

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

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

PATOČKA, Jiří, 2003. *Úvod do obecné toxikologie*. 1. vyd. Praha: Manus. ISBN 978-80-86571-04-1.

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

PETRAKIS, Demetrios, Loukia VASSILOPOULOU, Charalampos MAMOULAKIS, Christos PSYCHARAKIS, Aliko ANIFANTAKI, Stavros SIFAKIS, Anca DOCEA, John TSIAOISSIS, 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

PROKEŠ, Jaroslav, 2005. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén : Karolinum. ISBN 978-80-7262-301-3.

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

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

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

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

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.

SPIEGELMAN, B. M. a J. S. FLIER, 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. **87**(3), 377–389. ISSN 0092-8674.

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

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.

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

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

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

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>

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.

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

ZLOCH, Zdeněk a Iva KLADNICKÁ, 2018. Nové pohledy na význam rostlinných polyfenolů ve výživě. *Výživa a potraviny*. **2018**(5), 127–131.

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]