

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ  
DEPARTAMENTUL III ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

**IONICĂ MIHAELA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**NOI PERSPECTIVE ASUPRA DISFUNȚIEI ȚESUTULUI  
ADIPOS ȘI VASCULAR LA PACIENȚII CU OBEZITATE ȘI  
STATUS INFLAMATOR**

**REZUMAT**

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. DANINA M. MUNTEAN**

**Timișoara  
2020**

## CUPRINS

Lista publicațiilor .....	III
Lista abrevierilor.....	V
Lista figurilor.....	VII
Lista tabelor.....	X
Mulțumiri .....	XII
Introducere.....	XV

### PARTEA GENERALĂ - REVIEW AL LITERATURII

1. OBEZITATEA ȘI DEFICITUL DE VITAMINĂ D: DUBLA EPIDEMIE .....	1
1.1. Epidemia obezității .....	1
1.2. Epidemia deficitului de vitamină D .....	6
2. PATOGENEZA DISFUNCȚIEI ȚESUTULUI ADIPOS ÎN OBEZITATE .....	11
2.1. Patogeneza disfuncției țesutului adipos în obezitatea adultului .....	11
2.2. Patogeneza disfuncției țesutului adipos în obezitatea copilului .....	16
3. PATOGENEZA DISFUNCȚIEI VASCULARE ÎN OBEZITATE.....	24
3.1. Rolul inflamației și a stresului oxidativ în patogeneza disfuncției endoteliale .....	24
3.2. Rolul țesutului adipos perivascular în disfuncția vasculară .....	32
3.3. Contribuția mao la disfuncția vasculară .....	33

### PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE

4. MOTIVAȚIA ȘI SCOPUL STUDIULUI .....	35
5. Materiale și metode.....	37
6. Rezultate .....	49
6.1. Caracterizarea profilului clinico-biologic în obezitate: corelații cu parametrii clinici și de laborator .....	49
6.2. Contribuții la evaluarea stresului oxidativ în țesutul adipos.....	66
6.3. Contribuții la evaluarea stresului oxidativ în disfuncția vasculară .....	81
6.4. Contribuții la evaluarea disfuncției respiratorii mitocondriale la nivelul țesutului adipos .....	97
7. DISCUȚII .....	110
8. CONCLUZII.....	113
REFERINȚE.....	116
ANEXE.....	I

**CUVINTE-CHEIE:** obezitate, inflamație cronică de grad redus, țesut adipos visceral, artera mezenterică, disfuncție endotelială, disfuncție mitocondrială, stres oxidativ, monoamino-oxidază, vitamina D.

## I. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obezitatea este considerată actual drept cea mai severă pandemie, afectând aproximativ 1/3 din populația lumii și care, împreună cu diabetul zaharat de tip II, reprezintă bolile metabolice asociate, în principal, cu complicații cardio-vasculare cu risc vital. Obezitatea a fost asociată totodată cu un deficit de vitamină D, dar fiziopatologia acestei asocieri este doar parțial elucidată.

În ultimele decenii, *disfuncția țesutului adipos visceral (TAV) indusă de obezitate* a reprezentat un domeniu activ de cercetare în vederea identificării și caracterizării mecanismelor fiziopatologice atât adaptative, cât și maladaptative. Mai mult, *disfuncția endotelială* și *disfuncția mitocondrială* au fost explorate sistematic în cadrul a numeroase studii animale și respectiv, mai puține studii umane.

Toate aceste trei disfuncții prezintă ca mecanisme patogenice comune *inflamația cronică* și *stresul oxidativ* care se potențează reciproc pe termen lung într-un cerc vicios. În ceea ce privește cel de-al doilea mecanism, contribuția monoamino-oxidazei (MAO), enzimă mitocondrială cu 2 izoforme, MAO-A și B, la stresul oxidativ cardio-vascular fost descrisă în ultimele decenii. Astfel, un număr în continuă creștere de articole recente corelează creșterea activității și/sau expresiei uneia sau ambelor izoforme MAO cu dezvoltarea și/sau progresiunea bolilor cardiace și vasculare. Există relativ puține date în literatura de specialitate cu privire la rolul stresului oxidativ indus de MAO la nivelul țesutului adipos. Astfel, studiile cu privire la expresia, reglarea și funcția MAO în țesutul adipos reprezintă un direcție activă de cercetare.

Scopul prezentei teze de doctorat a constat în caracterizarea sistematică a **disfuncției țesutului adipos visceral și respectiv, a țesutului vascular, cu accent pe rolul stresului oxidativ indus de MAO în contextul obezității atât la adulți, cât și la copii**. Mai mult, noi abordări terapeutice, precum inhibitorii de MAO și vitamina D, au fost investigate în cadrul unor experimente *in vitro* în vederea identificării unor ținte terapeutice capabile să asigure ameliorarea deopotrivă a disfuncției țesutului adipos cât și a disfuncției endoteliale în condițiile obezității la om.

**Obiectivele cercetării** au fost următoarele:

**1. Evaluarea profilului pacientului obez: corelații între parametrii clinici și de laborator la adulți și copii.**

**2. Caracterizarea disfuncției țesutului adipos** la nivelul probelor de **țesut adipos visceral** prelevate de la pacienți adulți și pediatrici cu și fără obezitate, supuși intervențiilor de chirurgie generală: evaluarea *in vitro* a stresului oxidativ, a expresiei MAO și a efectelor incubării cu inhibitorul MAO și vitamina D activă (calcitriol) asupra producției de specii reactive de oxigen (SRO).

**3. Caracterizarea disfuncției vasculare** la nivelul **ramurilor arterei mezenterice** prelevate de la pacienți adulți cu și fără obezitate, supuși intervențiilor de chirurgie generală: evaluarea *in vitro* a stresului oxidativ, a expresiei MAO și a efectelor incubării cu inhibitorul MAO și calcitriol asupra producției de SRO.

**4. Caracterizarea disfuncției mitocondriale** la nivelul probelor de **țesut adipos visceral** prelevate de la pacienți adulți și pediatrici cu și fără obezitate, supuși intervențiilor de chirurgie generală: evaluarea *in vitro* a respirației mitocondriale și a efectelor adiției acute de calcitriol.

## II. CONTRIBUȚII LA CARACTERIZAREA PROFILULUI PACIENȚILOR CU OBEZITATE: CORELAȚII CU PARAMETRII CLINICI ȘI DE LABORATOR

Pacienții incluși în acest studiu pilot au fost grupați în două loturi în funcție de vârstă: adulți ( $n=30$ ) și copii ( $n=26$ ). Fiecare lot a fost ulterior clasificat, în funcție de valoarea IMC, în 2 subgrupuri, pacienți cu și fără obezitate. La pacienții *adulți obezi* analiza parametrilor de laborator a evidențiat prezența unui nivel crescut al markerilor inflamatori, cu o diferență statistic semnificativă pentru PCR ( $p = 0.02$ , Fig. 1 - stg) și o tendință pentru valori mai crescute ale VSH. Important, toți pacienții (obezi și non-obezi) au avut valori anormale ale 25(OH)-vitaminei D serice. În timp ce pacienții normoponderali au prezentat nivele insuficiente ( $<30$  ng/ml), pacienții cu obezitate au avut deficit de vitamină D cu valori sub 20 ng/ml. Vitamina D serică a prezentat o corelație negativă cu valorile IMC ( $r = -0.476$ ,  $p < 0.05$ ) cu o tendință de clusterizare care a devenit evidentă când cele 2 variabile au fost reprezentate grafic (Fig. 1 - dr).

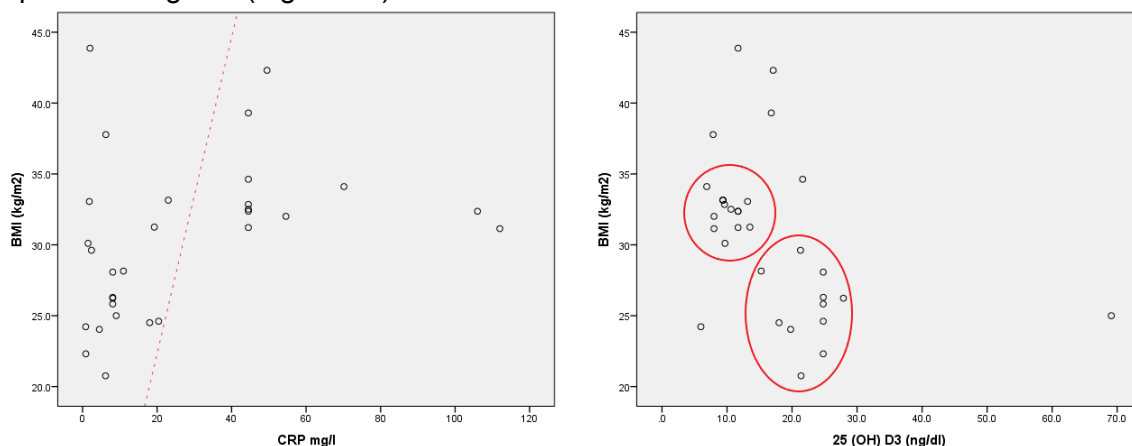


Figura 1. Corelația dintre valorile IMC și proteina C reactivă (CRP, stânga) și clusterizarea vitaminei D în funcție de IMC (dreapta), la pacienții adulți.

La *copiii cu obezitate*, ambii markeri inflamatori au fost semnificativ crescuți ( $p=0.002$  pentru VSH și respectiv,  $p=0.007$ , pentru CRP) - spre deosebire de adulți obezi unde doar pentru nivelul CRP a fost identificată o diferență semnificativă (Figura 2).

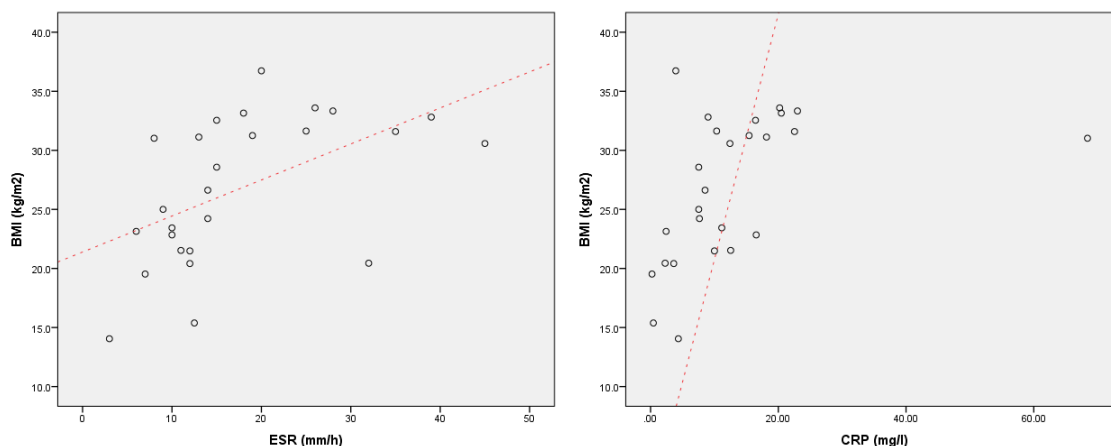


Figura 2. Corelații între valoarea IMC și nivelul VSH (stânga), respectiv valoarea IMC și nivelul CRP (dreapta), la lotul de pacienți pediatrici.

La lotul de copii, nivelul seric al vitaminei D a prezentat modificări similare celor de la adulți, cu insuficiență vs. deficiență pentru copiii normoponderali, respectiv obezi ( $p=0.04$ ). Cu toate acestea, spre deosebire de adulți, nu s-a obținut o corelație negativă între nivelul vitaminei D și IMC la copiii cu obezitate. Ca particularitate, profilul lipidic la copii a fost normal indiferent de greutate, cu excepția HDL-colesterolului care a fost semnificativ crescut la subgrupul copiilor non-obezi vs cei obezi ( $p<0.01$ ).

### III. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA STRESULUI OXIDATIV LA NIVELUL ȚESUTULUI ADIPOS VISCERAL

Evaluarea producției de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) prin metoda spectrofotometrică (tehnica FOX) la nivelul eșantioanelor de țesut adipos visceral (TAV) ale adulților obezi, a demonstrat un nivel semnificativ mai mare de ( $5.74 \pm 0.21$  nM  $H_2O_2$ /h/mg țesut,  $p<0.01$ ) comparativ cu valorile înregistrate la adulții normoponderali ( $3.09 \pm 0.32$  nM  $H_2O_2$ /h/mg țesut). În continuare, incubarea timp de 12 ore a probelor cu calcitriol (100 nM) a redus semnificativ nivelul stresului oxidativ la pacienții obezi și nu a avut efect la cei non-obezi (Fig. 3 A).

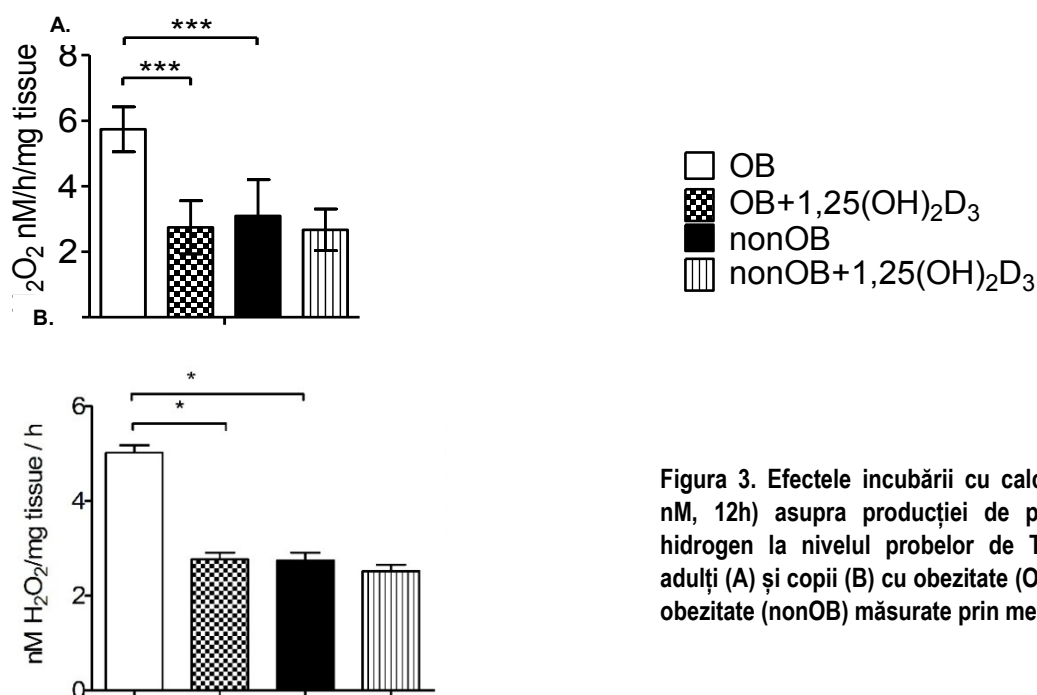


Figura 3. Efectele incubării cu calcitriol (100 nM, 12h) asupra producției de peroxid de hidrogen la nivelul probelor de TAV de la adulți (A) și copii (B) cu obezitate (OB) vs. fără obezitate (nonOB) măsurate prin metoda FOX.

Similar, în cazul probelor de TAV prelevate de la copiii obezi a fost înregistrată o valoare medie de  $5.03 \pm 0.16$  nM  $H_2O_2$ /h/mg țesut vs  $2.71 \pm 0.18$  nM  $H_2O_2$ /h/mg țesut la cei normoponderali ( $p<0.5$ ). Și în cazul copiilor obezi, nivelul stresului oxidativ în eșantioanele de țesut adipos a fost semnificativ mai redus după incubarea acută cu forma activă a vitaminei D, atingând valori medii apropiate de cele ale lotului martor, respectiv  $2.78 \pm 0.15$  nM  $H_2O_2$ /h/mg țesut ( $p<0.01$ ) - Fig. 3 B.

De asemenea, stresul oxidativ evaluat prin imunofluorescență (IF) utilizând markerul dihidroetidium (DHE) a fost semnificativ mai mare la pacienții adulți cu obezitate vs. cei normoponderali, efectul benefic al incubării cu 1,25(OH) $_2$ D $_3$  (calcitriol) fiind evident în prezența obezității și absent în lipsa acesteia (Fig. 4 - stg). Același pattern privind producția de SRO în IF și respectiv, răspunsul la vitamina D s-a observat și la lotul de copii (Fig. 4 - dr).

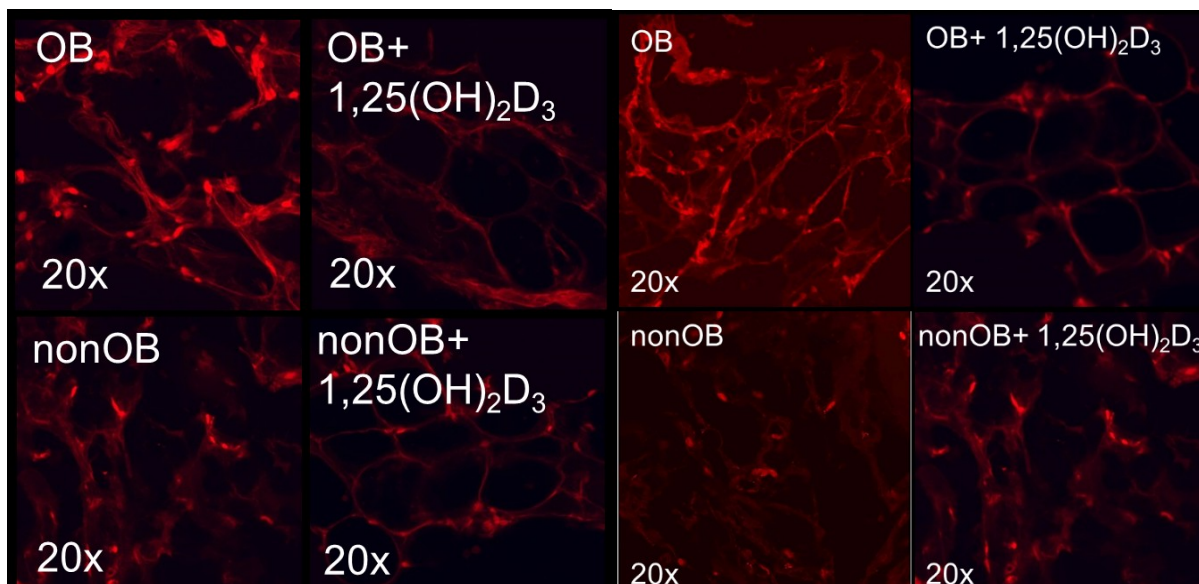


Figura 4. Efectele incubării cu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (100 nM, 12h) asupra producției de peroxid de hidrogen la nivelul probelor de țesut adipos visceral de la adulți (stg) și copii (dr) obezi (OB) vs. non-obezi (nonOB) evaluate prin IF (colorație cu DHE).

O altă observație importantă a fost corelația dintre severitatea stresului oxidativ și gradul de obezitate, pe de-o parte (și cu statusul inflamator, pe de altă parte). Astfel, la adulți o corelație pozitivă puternică ( $r=0.69$ ,  $p<0.01$ ) a fost găsită între producția locală de  $\text{H}_2\text{O}_2$  în țesutul adipos (măsurată prin metoda FOX) și IMC, cu formarea unui tipar de două clustere (Fig. 5 - stg). Important, la copii corelația IMC – producția de SRO a fost mai puternică decât în cazul adulților ( $r = 0.821$ ,  $p<0.001$ ), sugerând un impact mai mare al creșterii ponderale asupra stresului oxidativ la vârste mai tinere (Fig. 5 - dr).

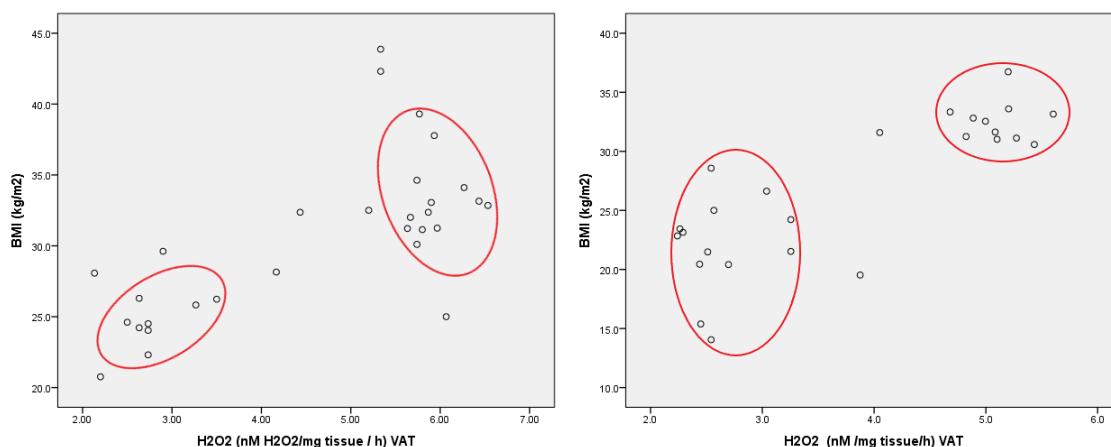


Figura 5. Corelația între IMC și producția locală de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (metoda FOX) la pacienții adulți (stânga) și pediatrici (dreapta).

Studiile imunohistochemice (IH) au evidențiat prezența ambelor izoforme MAO-A și MAO-B în TAV de la adulții obezi, cu o predominanță netă a celei dintâi (Fig. 6 – stg). Cuantificarea qPCR expresiei genice (mRNA) prin tehnica qPCR a evidențiat o creștere semnificativă a MAO-A la nivelul probelor de TAV prelevate de la pacienții OB vs non-OB ( $p<0.05$ , Fig. 6 – dr).

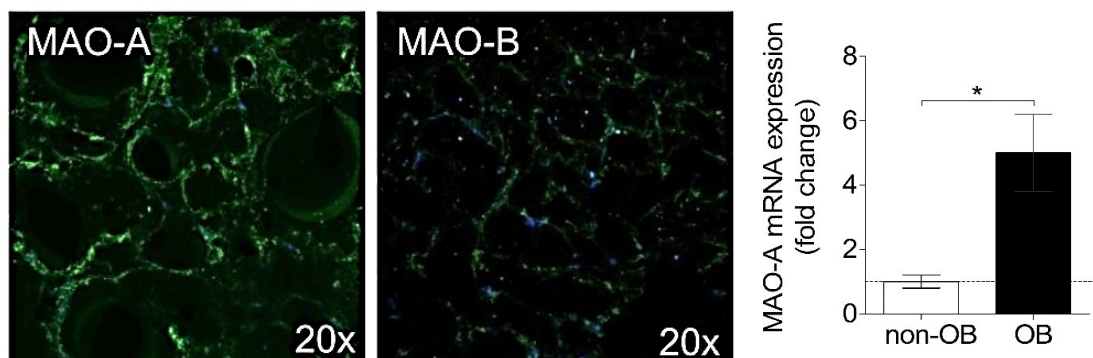


Figura 6. Expresia MAO în țesutul adipos al adulților obezi în IH, verde – anticorpi anti-MAO-A, albastru - DAPI (stânga). Expresia genică a izoformei MAO-A în țesutul adipos al pacienților OB vs non-OB la qPCR, \* $p < 0.05$  (dreapta).

Incubarea *ex vivo* cu clorgilină, inhibitorul ireversibil al izoformei MAO-A, a redus semnificativ producția de peroxid de hidrogen la nivelul țesutului adipos de la pacienții adulți obezi ( $p < 0.05$ ) și nu a influențat producția acestuia la cei normoponderali. Rezultate similare au fost observate și la studiile de imunofluorescență (IF) cu DHE, cu o reducere semnificativă a stresului oxidativ după incubarea cu clorgilină ( $p < 0.05$ ) în probele de TAV ale pacienților cu obezitate vs lipsa unor diferențe semnificative ale intensității semnalului la pacienții non-obezi (Figura 7).

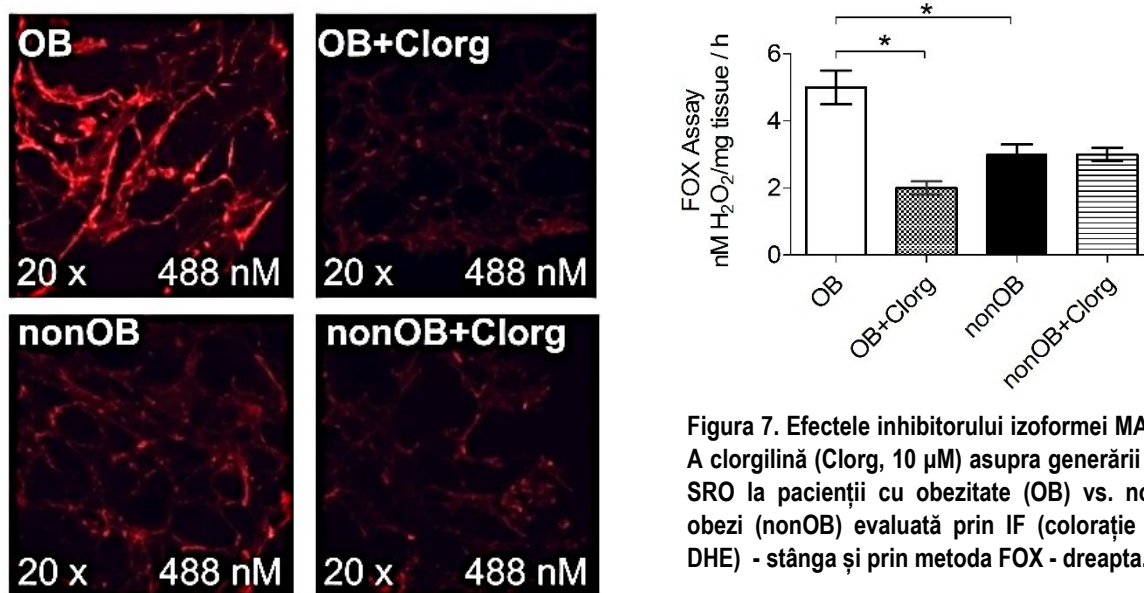


Figura 7. Efectele inhibitorului izoformei MAO-A clorgilină (Clogr, 10  $\mu$ M) asupra generării de SRO la pacienții cu obezitate (OB) vs. non-obezi (nonOB) evaluată prin IF (colorație cu DHE) - stânga și prin metoda FOX - dreapta.

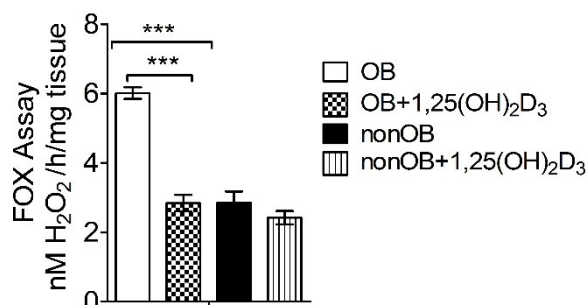
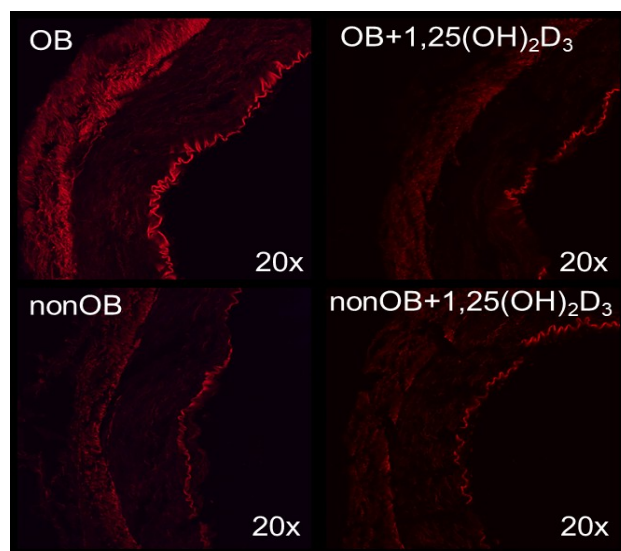
#### IV. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA DISFUNȚIEI ȚESUTULUI VASCULAR

Evaluarea stresului oxidativ vascular a condus la rezultate comparabile cu cele de la nivelul țesutului adipos. Astfel, studiile de IF au demonstrat o diferență similară între loturi, producția de SRO fiind semnificativ crescută la pacienții obezi vs. fără obezitate (Fig. 8 - stg).

Nivelul de peroxid de hidrogen în eșantioanele vasculare (ramuri ale a. mezenterice) ale adulților obezi a prezentat o valoare medie de  $6.01 \pm 0.17$  nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/h/mg țesut vs  $2.85 \pm 0.33$  nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/h/mg țesut la pacienții normoponderali ( $p < 0.01$ ), Fig. 8 - dr. Incubarea



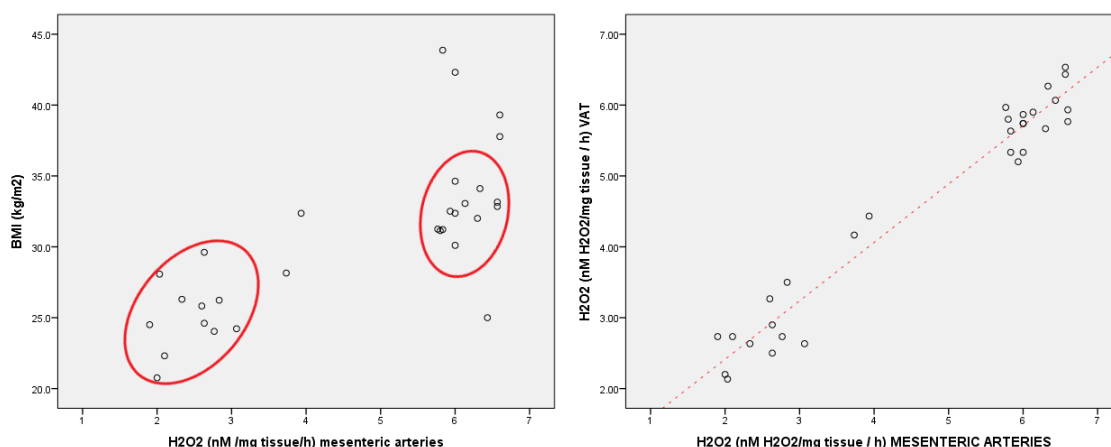
timp de 12 h cu calcitriol (100 nM) a redus semnificativ stresul oxidativ local în inelele vasculare ale pacienților cu obezitate, cu discrețe diferențe observate în cazul probelor de la adulții normoponderali.



**Figura 8.** Efectele incubării cu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (100 nM, 12h) la nivelul ramurilor arterei mezenterice de la pacienți adulți obezi (OB) vs. non-obezi (nonOB) evaluate în IF (colorație cu DHE) - stânga și prin metoda FOX - dreapta.

După cum a fost descris și în cazul TVA, producția locală de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în ramurile arterei mezenterice a fost semnificativ corelată cu gradul de obezitate (și cu statusul inflamator - date neprezentate). Astfel, IMC a prezentat o corelație pozitivă puternică ( $r=0.736$ ,  $p<0.01$ ) cu producția locală de peroxid de hidrogen (metoda FOX) și o tendință similară de clusterizare ale valorilor scăzute, respectiv crescute (Fig. 9 - stg).

Important, producția de peroxid de hidrogen din probele vasculare a prezentat o corelație pozitivă foarte puternică cu cea măsurată în TAV ( $r=0.980$ ,  $p<0.01$ ), sugerând o linearitate a stresului oxidativ local între cele 2 tipuri de țesut în contextul obezității adultului (Fig. 9 - dr).



**Figura 9.** Corelații între IMC și nivelul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în ramurile arterei mezenterice de la pacienții adulți (stânga). Corelații între producția de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în țesutul adipos și inelele vasculare la pacienții adulți (dreapta).

Evaluarea funcției vasomotorii (prin studii în baie de organ) a ramurilor arterei mezenterice, a demonstrat o creștere semnificativă a contractilității, la doze cumulative de fenilefrină (Phe), în cazul inelelor izolate de la pacienții cu vs fără obezitate ( $p<0.05$ ). Important, relaxarea dependentă de endoteliu la doze cumulative de acetilcolină (Ach) a fost semnificativ redusă în cazul arterelor prelevate de la pacienții obezi vs non-obezi ( $p<0.05$ , Fig. 10).



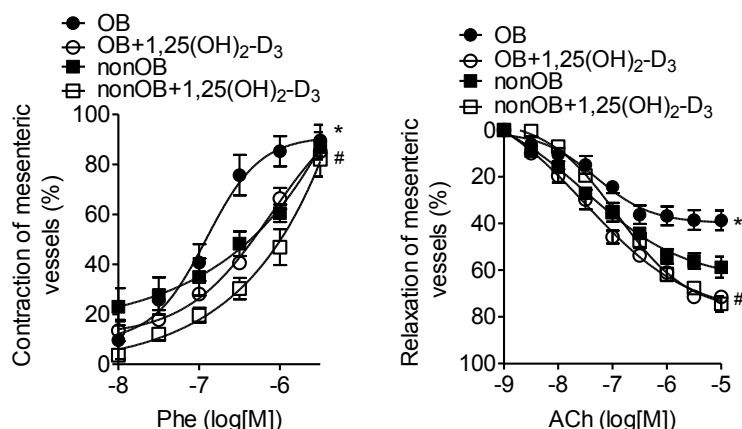


Figura 10. Efectele incubării cu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (100 nM, 12h) asupra contracției induse de fenilefrină și a relaxării induse de acetilcolină a inelelor preparate din ramurile arterei mezenterice de la pacienții adulți obezi (OB) și non-obezi (nonOB).

În continuare au fost evaluate efectele răspunsului vasomotor după incubarea acută cu vitamina D activă (100 nM). În prezența 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, contractilitatea vasculară a scăzut și relaxarea dependentă de endoteliu s-a îmbunătățit semnificativ la nivelul inelelor vasculare preparate de la adulții cu obezitate; similar țesutului adipos, nu s-au obținut diferențe semnificative la adulții normoponderali în urma incubării cu vitamina D (Fig. 10).

Ca și în cazul țesutului adipos, atât MAO-A, cât și MAO-B au fost prezente la nivelul ramurilor de arteră mezenterică prelevate de la pacienții obezi, MAO-A fiind izoforma predominantă (Fig. 11 - stg). Analiza expresiei genice a MAO-A (mRNA) la nivelul probelor vasculare a prezentat o creștere semnificativă în inelele vasculare de la pacienții OB vs non-OB (Fig.11 - dr).

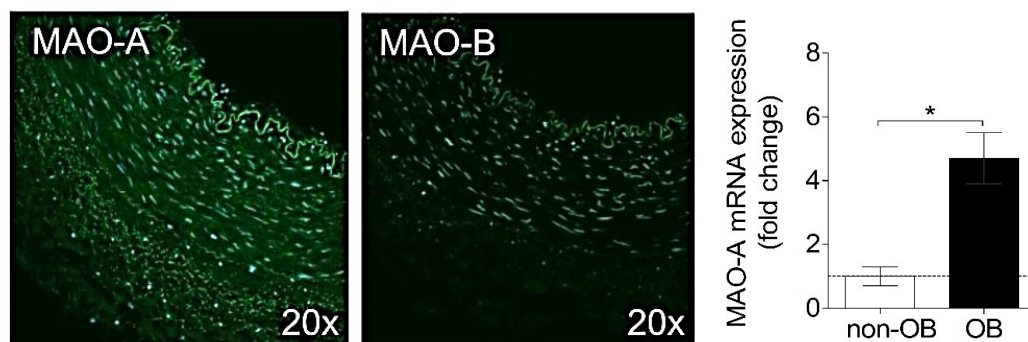


Figura 11. Expresia MAO în ramurile arterei mezenterice ale adulților cu obezitate – IH, verde–anticorpi anti-MAO-A, albastru - DAPI (stânga). Expresia genică a MAO-A (mARN) în ramurile arterei mezenterice ale adulților obezi (OB) vs non-obezi (nonOB) – qPCR, \*p<0.05 (dreapta).

Inflamația este o cauză bine documentată a disfuncției endoteliale, fără ca efectul acesteia asupra nivelului MAO să fie descris la om. Stimularea *in vitro* a ramurilor arterei mezenterice prin incubare cu IL-6 (100 ng/ml, 12 h) a prezentat o creștere semnificativă a nivelului mRNA al MAO-A la qPCR atât la copii, cât și la adulți cu obezitate (Figura 12).

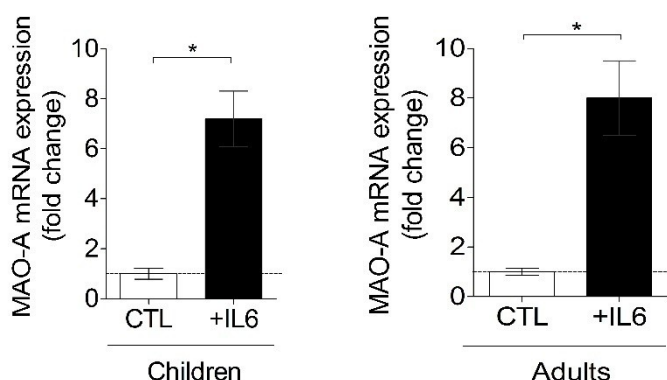


Figura 12. Expresia genei MAO-A în ramurile arterei mezenterice la copii (stânga) și adulți (dreapta) după stimularea cu IL-6 (100 ng/ml, 12 h).

Pentru a evalua contribuția MAO la stresul oxidativ vascular, inelele au fost incubate *ex vivo* cu inhibitorul ireversibil al MAO-A, clogilina. Cuantificarea producției de peroxid de hidrogen prin metoda FOX a demonstrat o reducere semnificativă a stresului oxidativ la nivelul inelelor vasculare de la pacienții cu obezitate (nu și la cei non-obezi) - Fig. 13 - dr). Aceste rezultate au fost confirmate și de studiile de IF care au arătat o reducere semnificativă a nivelului de SRO al ramurilor areteri mezenterice ale pacienților obezi în urma incubării cu clogilină (Fig. 13 - stg).

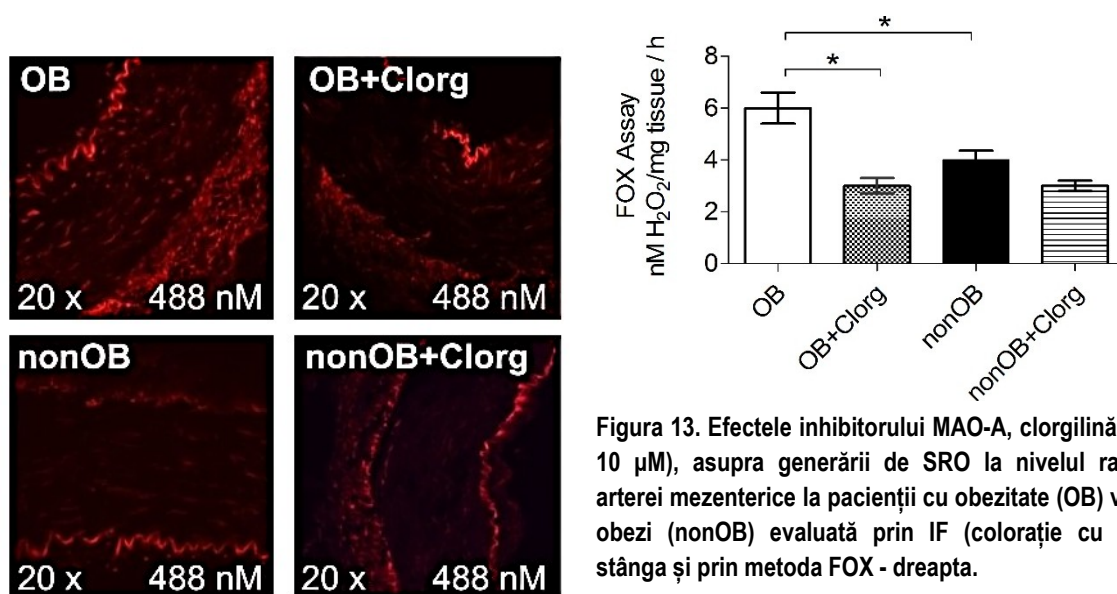


Figura 13. Efectele inhibitorului MAO-A, clogilina (Clorg, 10  $\mu$ M), asupra generării de SRO la nivelul ramurilor arterei mezenterice la pacienții cu obezitate (OB) vs. non-obezi (nonOB) evaluată prin IF (colorație cu DHE) - stânga și prin metoda FOX - dreapta.

Preparatele vasculare ale pacienților cu obezitate au prezentat o contractilitate crescută la doze cumulative de fenilefrină; cu toate acestea în urma incubării cu clogilină s-a remarcat o reducere semnificativă a răspunsului contractil comparativ cu valorile bazale ( $p < 0.05$ ) – Fig. 14 A. De asemenea, relaxarea dependentă de endoteliu la doze cumulative de ACh a arterelor pacienților obezi, a fost semnificativ îmbunătățită după incubare cu clogilină ( $p < 0.05$ ); inelele vasculare ale adulților non-obezi au prezentat modificări minime după incubare față de valorile bazale, fără semnificație statistică (Fig. 14 B).

Contribuția NO la efectul protector al inhibitorilor de MAO a fost testat în continuare prin evaluarea contractilității probelor vasculare în prezența L-NAME, un inhibitor clasic al sintetazei NO. Arterele pacienților obezi incubate cu clogilină au prezentat o reducere semnificativă a contractilității la L-NAME ( $p < 0.05$ ) - Fig. 14 C.

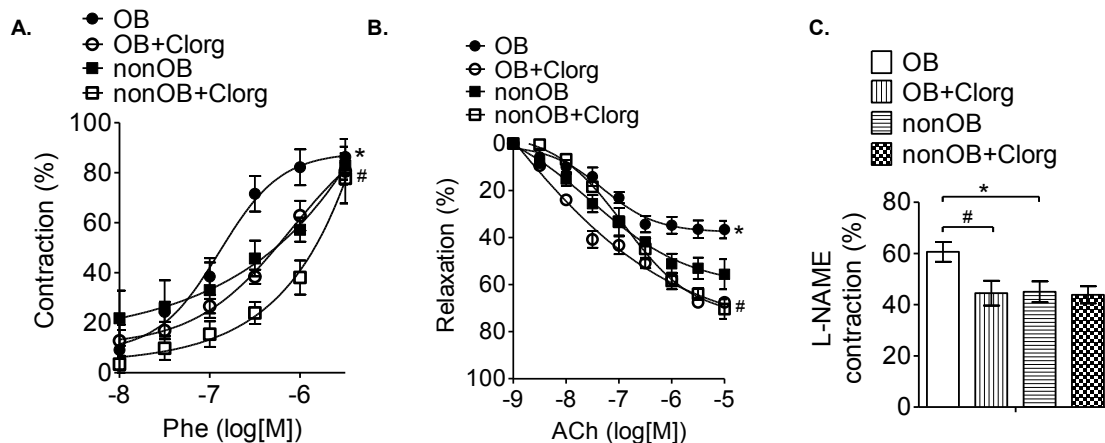


Figura 14. Contractie indusă de fenilefrină (A), relaxare dependentă de endoteliu indusă de acetilcolină (B), contractia la L-NAME (C) (10 $\mu$ M), la nivelul inelelor preparate din ramurile arterei mezenterice obținute de la adulții obezi (OB) și non-obezi (nonOB), incubate sau nu cu inhibitorul de MAO-A, clorgilină (Clorg, 10  $\mu$ M, 30 min). \* $p < 0.05$  OB vs. nonOB, # $p < 0.05$  OB vs. OB+Clorg.

## V. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA DIS/FUNCȚIEI MITOCONDRIALE RESPIRATORII LA NIVELUL ȚESUTULUI ADIPOS

Într-un subgrup al pacienților adulți, eșantioanele de TAV de la pacienți non-obezi (n = 8) vs. obezi (n = 10) a fost evaluat prin respirometrie de înaltă rezoluție (HRR) pentru a evalua prezența disfuncției respiratorii mitocondriale. Toate ratele respiratorii: respirația bazală (sau stadiul 2, St 2), respirația maximă activă (sau OXPHOS) și respirația maximă decuplată (sau ETS) au fost moderat reduse la adulții obezi vs cei non-obezi (Tabelul 1).

Spre deosebire de adulți, la copiii obezi (n=7) vs non-obezi (n=9), am observat o reducere marcată a tuturor stărilor respiratorii în contextul obezității infantile, cea mai pronunțată diferență fiind observată pentru respirația bazală, cu 76% mai redusă comparativ cu lotul martor (Tab. 1).

Tabelul 1. Modificările ratelor respiratorii mitocondriale la nivelul țesutului adipos de la pacienți adulți și pediatrici.

Patients	Basal respiration (State 2)	Active respiration (OXPHOS)	Uncoupled respiration (ETS)
<b>Adults</b>			
<i>Obese vs control</i>	-21%	-35%	-20%
<b>Children</b>			
<i>Obese vs control</i>	-76%	-70%	-69%

O diferență (deși nesemnificativă) a fost observată între ratele respiratorii ale adulților și copiilor obezi. În principal, atât respirația activă (OXPHOS) cât și cea decuplată (ETS) au fost ușor mai scăzute - cu 27% și 24% la copii obezi vs adulții obezi (Fig. 15). Aceste rezultate sugerează că obezitatea ar putea avea un impact mai important asupra funcției mitocondriale respiratorii la nivelul țesutului adipos la copii față de adulți.

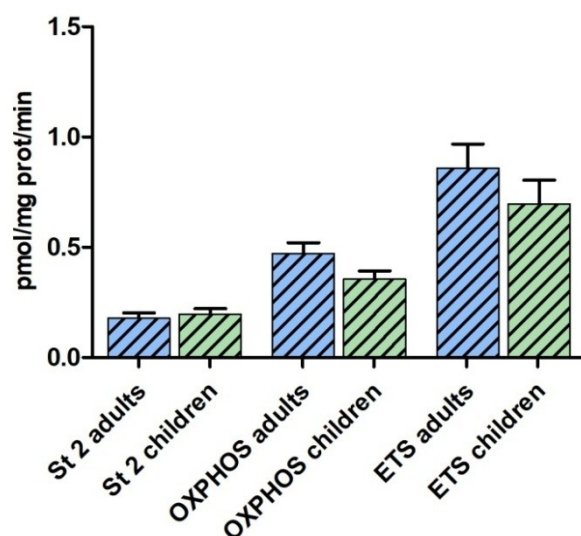


Figura 151. Modificările ratelor respiratorii mitocondriale la adulți obezi vs copiii obezi.

Reducerea ratelor respiratorii mitocondriale observate la copiii obezi comparativ cu adulții obezi sugerează că disfuncția mitocondrială precocă reprezintă un eveniment neexplorat și subestimat în secvența patogenică a obezității și care poate fi considerat o potențială țintă terapeutică în vederea prevenirii progresiunii și/sau tratamentul complicațiilor induse de obezitate în viața adultă. Studii suplimentare sunt necesare pentru a oferi o caracterizare mai complexă a structurii mitocondriale și a disfuncției pe loturi mai mari de pacienți în contextul obezității infantile.

Cu privire la efectele vitaminei D la nivelul țesutului adipos, două observații sunt relevante: i) prima, vitamina D determină modificări mai importante ale respirației țesutului adipos la pacienții non-obezi versus obezi, independent de vârstă și ii) a doua, modificările respirației maxime active și ale celei maxime decuplate sunt în sens opus, respectiv, în prezența vitaminei D (100 nm), scad la adulți și o cresc la copii, observații ce necesită investigații ulterioare.

## VI. CONCLUZII

1. Obezitatea este asociată cu statusul inflamator atât la copiii, cât și la adulții; IMC-ul este corelat pozitiv cu nivelul seric al PCR și VSH la copii, respectiv cu PCR la adulți.
2. La copiii cu obezitate s-au înregistrat valori semnificativ mai mici ale HDL colesterolului comparativ cu cei non-obezi.
3. Deficitul vitaminei D a fost o caracteristică comună a copiilor și adulților obezi, pe când persoanele normoponderale au prezentat nivele insuficiente ale vitaminei D.
4. Nivelul vitaminei D a prezentat o corelație negativă puternică cu valoarea IMC la adulți (dar nu și în cazul copiilor).
5. Stresul oxidativ, evaluat prin spectrofotometrie și microscopie confocală, a fost semnificativ crescut la nivelul țesutului adipos visceral și ramurile arterei mezenterice ale pacienților cu obezitate vs indivizii normoponderali.

6. Producția locală de peroxid de hidrogen la nivelul probelor de țesutul adipos visceral și vascular a prezentat o corelație pozitivă puternică cu valorile IMC atât la adulți, cât și copii; două cluster individuale s-au evidențiat pentru ambele tipuri de țesut, cu agregarea nivelelor reduse de  $H_2O_2$  cu valorile scăzute ale IMC și respectiv, a nivelelor crescute de  $H_2O_2$  cu valorile mari ale IMC.
7. O corelație pozitivă foarte puternică a fost observată între nivelul  $H_2O_2$  din țesutul adipos și ramurile arterei mezenterice, observație sugestivă pentru un nivel comparabil de stress oxidativ local în țesutul adipos și cel vascular în contextul obezitității.
8. Vitamina D a redus semnificativ producția de SRO la nivelul probelor de țesut adipos și vascular ale pacienților obezi, cu efecte minime asupra celor de la indivizii normoponderali.
9. Incubarea *ex vivo* cu forma activă a vitaminei D (în concentrații submicromolare) a îmbunătățit semnificativ relaxarea dependentă de endoteliu și a redus contractilitatea preparatelor vasculare de la pacienții cu obezitate.
10. Efectul antioxidant al vitaminei D nu este mediat printr-o acțiune de tip scavenger în aceste țesuturi.
11. MAO-A este izoforma predominantă identificată în țesutul adipos și cel vascular în contextul obezitității, după cum a fost demonstrat în microscopie confocală.
12. Pacienții cu obezitate au prezentat nivele semnificativ mai mari ale mRNA al MAO-A la qPCR comparativ cu pacienții normoponderali.
13. Expunerea acută *ex vivo* la IL-6 a crescut semnificativ expresia mRNA a izoformei MAO-A ramurile arterei mezenterice prelevate de la pacienții adulți și pediatrici.
14. Inhibarea acută *ex vivo* a MAO-A cu inhibitorul ireversibil, clorgilină, a ameliorat semnificativ stresul oxidativ la nivelul țesutului adipos și în arterele mezenterice ale pacienților cu obezitate.
15. Inhibarea acută *ex vivo* a MAO-A cu clorgilină a ameliorat semnificativ disfuncția endotelială de la nivelul arterelor mezenterice ale pacienților adulți cu obezitate.
16. Respirația mitocondrială este redusă la nivelul probelor de țesut adipos visceral prelevate de la adulții și copiii obezi.
17. Ratele respiratorii mitocondriale bazale sunt mai mari (până la 70%) la copiii normoponderali comparativ cu adulții normoponderali; aceste valori sunt mai reduse (cu până la 25%) la copiii cu obezitate vs adulții cu obezitate.
18. Expunerea acută *ex vivo* a țesutului adipos la forma activă a vitaminei D a determinat modificări mai importante ale respirației mitocondriale la indivizii non-obezi vs pacienții cu obezitate, indiferent de vârstă.
19. Un efect dihotomic al vitaminei D a fost observat, după expunerea acută *ex vivo*, asupra respirației țesutului adipos, i.e. o reducere a fost remarcată la adulți, respectiv o creștere la copii.

## VII. CONTRIBUȚII ORIGINALE

- Administrarea acută *ex vivo* a formei active a vitaminei D ameliorează stresul oxidativ la nivelul țesutului adipos visceral atât la adulții cât și la copiii cu obezitate.
- Administrarea acută *ex vivo* a formei active a vitaminei D reduce stresul oxidativ și îmbunătățește reactivitatea vasculară a ramurilor arterei mezenterice izolate de la adulții cu obezitate.
- Obezitatea și inflamația sunt asociate cu o expresie crescută a MAO-A la nivelul țesutului adipos visceral și a celui vascular la adulții și copiii cu obezitate.
- MAO-A este o sursă de SRO în țesutul adipos visceral și vasele mezenterice în prezența inflamației cronice de grad redus și obezității.
- Inhibarea acută *ex vivo* a MAO-A reduce generarea de SRO în țesutul adipos visceral și vascularizația mezenterică a adulților obezi.
- Inhibarea acută *ex vivo* a MAO-A îmbunătățește reactivitatea vasculară a ramurilor arterei mezenterice izolate de la adulții cu obezitate.
- Respirația mitocondrială este redusă în țesutul adipos visceral al pacienților cu obezitate, în special la copii.
- Expunerea acută *ex vivo* la forma activă a vitaminei D a determinat modificări opuse ale respirației țesutului adipos, anume o reducere la adulți, respectiv o creștere la copii.

## VIII. DIRECȚII DE CERCETARE VIITOARE

- Elucidarea mecanismelor efectului antioxidant al vitaminei D.
- Investigarea efectului deficitului de vitamină D în contextul obezității asupra recuperării postoperatorii, în principal a relației cu infecțiile bacteriene și insuficiența de organ.
- Investigarea prezenței unei expresii crescute a MAO în țesutul adipos în contextul altor boli cronice, mai ales în prezența diabetului zaharat.
- Confirmarea efectelor benefice ale inhibiției reversibile a MAO *in vivo* asupra țesutului adipos și disfuncției endoteliale printr-un studiu clinic pilot.
- Caracterizarea în continuare a disfuncției respiratorii mitocondriale observate la nivelul țesutului adipos al adulților și copiilor cu obezitate, împreună cu explorarea altor anomalii mitocondriale (deficitul retenției de calciu, autofagia etc).
- Caracterizarea în continuare a efectelor *ex vivo* ale vitaminei D asupra funcției mitocondriale în contextul obezității.

## IX. PUBLICAȚII ȘTIINȚIFICE

1. **Ionică M.**, Aburel O.M., Văduva A., Petruș A., Rațiu S., Olariu S., Sturza A, Muntean D.M. **Vitamin D Alleviates Oxidative Stress in Adipose Tissue and Mesenteric Vessels from Obese Patients with Subclinical Inflammation.** *Can J Physiol Pharmacol.* 2020;98(2):85-92.doi: 10.1139/cjpp-2019-0340 (FI=2.041).
2. Sturza A., Olariu S., **Ionică M.**, Duicu O.M., Văduva A., Boia E., Muntean D.M., Popoiu C. **Monoamine Oxidase is a Source of Oxidative Stress in Obese Patients with Chronic Inflammation.***Can J Physiol Pharmacol.* 2019; 97(9):844-849. doi: 10.1139/cjpp-2019-0028 (FI=2.041).
3. Sturza A., Popoiu C.M., **Ionică M.**, Duicu O.M., Olariu S., Muntean D.M., Boia E.S. **Monoamine Oxidase-Related Vascular Oxidative Stress in Diseases Associated with Inflammatory Burden.***Oxid Med Cell Longev.* 2019; 8954201. doi: 10.1155/2019/8954201 (FI=4.868).