

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”  
DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL III ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

**IONICĂ LOREDANA-NICOLETA**



# **Rezumat**

**CONTRIBUȚII LA ELUCIDAREA EFECTELOR  
PROTECTOARE CARDIOVASCULARE ALE MEDICAȚIEI  
ANTIDIABETICE: FOCUS PE MONOAMINO OXIDAZĂ**

Coordonator științific

**PROF. UNIV. DR. MOZOȘ IOANA-MONICA**

**Timișoara**

**2024**

## CUPRINS

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE .....	VII
LISTA DE ABREVIERI ȘI SIMBOLURI .....	VIII
LISTA DE FIGURI .....	XI
LISTA DE TABELE .....	XIV
MULȚUMIRI.....	XV
INTRODUCERE.....	1
PARTEA GENERALĂ – DATE DIN LITERATURĂ .....	5
CAPITOLUL 1. STRESUL OXIDATIV MEDIAT DE MAO ÎN PATOLOGIA CARDIOVASCULARĂ: PREZENTARE GENERALĂ .....	5
CAPITOLUL 2. EFECTELE PROTECTOARE CARDIOVASCULARE ALE MEDICAȚIEI ANTIDIABETICE .....	18
PARTEA SPECIALĂ: CONTRIBUȚII PERSONALE .....	35
CAPITOLUL 3. MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI DOCTORAL.....	35
CAPITOLUL 4. METODOLOGIA CERCETĂRII .....	37
CAPITOLUL 5. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTELOR METFORMINULUI ASUPRA EXPRESIEI MAO, STRESULUI OXIDATIV ȘI REACTIVITĂȚII VASCULARE PE UN MODEL DE OBEZITATE INDUSĂ PRIN DIETĂ LA ȘOBOLAN.....	41
5.1. MOTIVAȚIE ȘI OBIECTIVE .....	41
5.2. MATERIALE ȘI METODE.....	42
5.3. REZULTATE .....	45
5.4. DISCUȚII .....	53
CAPITOLUL 6. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTULUI ANTIOXIDANT ACUT AL METFORMINULUI LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL IZOLAT DE LA PACIENȚII CARDIACI SUPRAPONDERALI, NON-DIABETICI .....	57
6.1. MOTIVAȚIE ȘI OBIECTIVE.....	57
6.2. MATERIALE ȘI METODE.....	58
6.3. REZULTATE.....	61
6.4. DISCUȚII .....	65
CAPITOLUL 7. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTELOR PROTECTOARE ALE METFORMINULUI ȘI EMPAGLIFLOZINULUI ASUPRA MAO SI A STRESULUI OXIDATIV LA NIVELUL ARTERELOR MAMARE IZOLATE DE LA PACIENȚII CORONARIENI SUPRAPONDERALI NON-DIABETICI .....	71
7.1. MOTIVAȚIE ȘI OBIECTIVE .....	71
7.2. MATERIALE ȘI METODE.....	72
7.3. REZULTATE.....	74
7.4. DISCUȚII .....	80
CAPITOLUL 8. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTELOR PROTECTOARE DE CLASĂ ALE EMPAGLIFLOZINULUI ȘI DAPAGLIFOZINULUI ASUPRA MAO SI A STRESULUI OXIDATIV LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL IZOLAT DE LA PACIENȚII CARDIACI SUPRAPONDERALI NON-DIABETICI .....	83
8.1. MOTIVAȚIE ȘI OBIECTIVITĂȚI .....	83
8.2. MATERIALE ȘI METODE.....	84
8.3. REZULTATE.....	86
8.4. DISCUȚII .....	93
CONCLUZII .....	99
BIBLIOGRAFIE .....	103
ARTICOLE PUBLICATE <i>IN EXTENSO</i> .....	I

**Cuvinte cheie:** monoaminooxidază, stres oxidativ, model animal, obezitate indusă prin dietă, supraponderabilitate, obezitate, insuficiență cardiacă, antidiabetice, metformin, inhibitori SGLT2, empagliflozin, dapagliflozin

## I. CONTEXTUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

La nivel mondial, bolile cardiovasculare continuă să fie principala cauză de morbiditate. În special, insuficiența cardiacă (IC) a devenit pe fondul îmbătrânirii populației, cea mai mare provocare pentru sistemele de sănătate din întreaga lume. De asemenea, odată cu pandemia de supraponderabilitate/obezitate, prevalența diabetului zaharat de tip 2 (DZ tip 2) a crescut dramatic și totodată utilizarea medicației antidiabetice. Atât antidiabeticele clasice (biguanide, metformin/METF), cât și cele noi (inhibitorii co-transportorului-2 de sodiu-glucoză/iSGLT2, empagliflozin/EMPA și dapagliflozin/DAPA) exercită o importantă protecție cardiovasculară, independentă de efectul lor hipoglicemiant. Mai mult, ultima clasă a devenit terapia de bază pentru întregul spectru al IC (cu FE redusă/IC-FER, ușor redusă /IC-FEUR și păstrată/IC-FEP), în absența DZ tip 2. În ultimele decenii, mecanismele celulare ce stau la baza protecției cardiovasculare au fost studiate sistematic, fiind însă incomplet elucidate; dintre acestea, efectul lor antioxidant a fost unul dintre cele mai studiate.

Stresul oxidativ este un mecanism fiziopatologic central responsabil de apariția și progresiunea bolilor cardio-metabolice și a IC, însă sursele speciilor reactive de oxigen (SRO) sunt departe de a fi complet elucidate. Monoaminoxidaza (MAO), cu 2 izoforme MAO-A și B, este o enzimă localizată la nivelul membranei mitocondriale externe, al cărei rol fiziologic constă în dezaminarea oxidativă a neurotransmițătorilor și a aminelor biogene, cu generarea constantă de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) ca principal produs secundar de reacție. În ultimele decenii, a existat un interes crescut pentru elucidarea contribuției stresului oxidativ legat de MAO la patogeneza bolilor cardio-metabolice și a abordărilor farmacologice capabile să îl atenueze. Actual, țintirea farmacologică a surselor celulare generatoare de SRO în condițiile unor patologii specifice este considerată în prezent drept cea mai fiabilă metodă de reducere a stresului oxidativ în locul prescrierii terapilor antioxidante.

Studiul interacțiunii dintre antidiabetice și MAO ca *sursă celulară constantă de SRO* în contextul supraponderabilității/obezității este deocamdată în fașă. La începutul studiilor doctorale, a existat un singur studiu experimental, pe un model de obezitate indusă prin dietă la șobolan, care a raportat că ambele izoforme MAO au fost supraexprimate și au contribuit la stresul oxidativ *cardiac*. Incubarea acută *ex vivo* a probelor de miocard ventricular cu METF a redus expresia MAO și a atenuat stresul oxidativ.

În literatura de specialitate nu existau date privind efectul METF asupra stresului oxidativ *vascular* mediat de MAO pe modele animale sau la om și nici informații privind *interacțiunea SGLT2i cu MAO la nivelul sistemul cardiovascular uman*.

**Scopul cercetării translaționale** a fost de a evalua efectele protectoare cardiovasculare ale METF, EMPA și DAPA, cu accent pe interacțiunea acestora cu MAO în contextul supraponderabilității/obezității. Subiectul ales corespunde temei nr. 2 "*Cercetarea translațională în domeniul stresului oxidativ (cu accent pe patologia cardiovasculară, disfuncția mitocondrială și activitatea MAO)*" inclusă în Strategia de cercetare a universității, precum și direcțiilor de cercetare ale Centrului de Cercetare Translațională și Medicină a Sistemelor din cadrul Departamentului III Științe funcționale, în cadrul căruia am fost afiliată în timpul studiilor doctorale.

**Obiectivele cercetării**, corespunzătoare celor 4 studii originale, au fost următoarele:

1. Evaluarea efectelor METF asupra funcției vasomotorii, expresiei MAO și a stresului oxidativ la nivelul aortelor izolate de la șobolani cu obezitate indusă prin dietă.
2. Evaluarea efectului antioxidant acut al METF la nivelul țesutului atrial prelevat de la pacienții supraponderali, non-diabetici cu IC-FEUR cu indicație de chirurgie cardiacă electivă.
3. Caracterizarea efectelor METF și EMPA asupra reactivității vasculare, expresiei MAO și a stresului oxidativ la nivelul arterelor mamare prelevate de la pacienții coronarieni supraponderali, non-diabetici cu IC-FEUR supuși terapiei de revascularizare.
4. Caracterizarea efectelor EMPA și DAPA asupra expresiei MAO și a stresului oxidativ la nivelul țesutului atrial prelevat de la pacienții supraponderali non-diabetici cu toate tipurile de IC cu indicație de chirurgie cardiacă electivă.

## II. STUDIUL 1: CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTELOR METFORMINULUI ASUPRA EXPRESIEI MAO, STRESULUI OXIDATIV ȘI A REACTIVITĂȚII VASCULARE PE UN MODEL DE OBEZITATE INDUSĂ PRIN DIETĂ LA ȘOBOLAN

Primul studiu a vizat investigarea interacțiunii METF-MAO la nivelul inelelor aortice izolate de la șobolani cu obezitate indusă de o dietă de tip cafeteria, un model experimental care imită alimentația nesănătoasă, una dintre cele mai frecvente etiologii ale obezității umane. Ipoteza de lucru a fost că expresia MAO este crescută după 24 de săptămâni de dietă și contribuie la stresul oxidativ vascular la animalele obeze, iar METF este capabil să contracareze efectele sale nefavorabile.

### 1. METFORMINUL A REDUS EXPRESIA IZOFORMELOR MAO-A ȘI B LA NIVELUL AORTELOR IZOLATE DE LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ PRIN DIETĂ

Ambele izoforme MAO-A și B au fost supraexprimate la nivelul inelelor aortice izolate de la șobolani obezi vs normoponderali. Incubarea acută *ex vivo* cu METF (10  $\mu$ M, 12 h) a scăzut atât expresia genică, cât și cea proteică a MAO la nivelul probelor vasculare de la șobolanii obezi și nu a avut niciun efect la lotul de control (Fig.1).

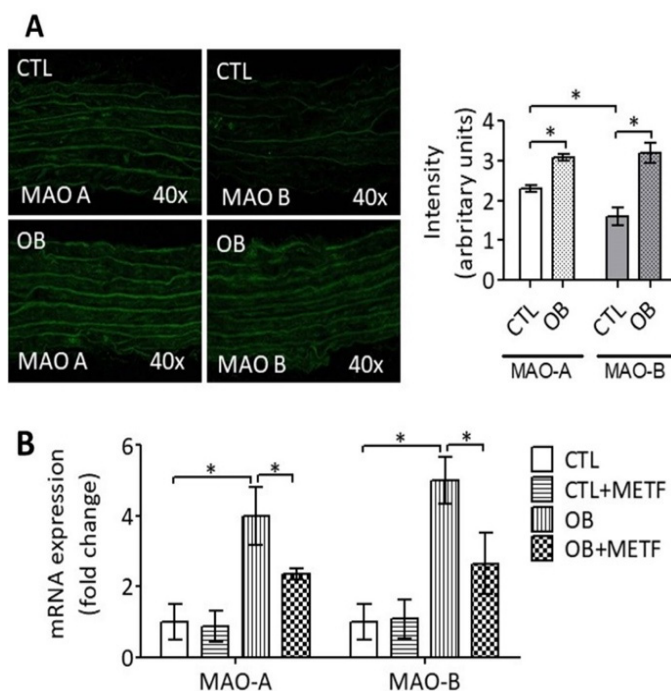


Figura 1. Metforminul a redus expresia crescută a MAO-A și B la nivelul inelelor aortice de la șobolanii obezi (OB, n = 8) vs. normoponderali (CTL, n = 8). (A) Expresia proteică a MAO-A și B. (B) Expresia genică (ARNm) a MAO-A și B \*p < 0,05

### 2. METFORMINUL A REDUS STRESUL OXIDATIV LA NIVELUL AORTELOR IZOLATE DE LA ȘOBOLANI CU OBEZITATE INDUSĂ PRIN DIETĂ

Stresul oxidativ, evaluat prin colorația cu dihidroethidium (DHE) în microscopie confocală pentru anionul superoxid (Fig. 2A) și prin tehnica spectrofotometrică FOX pentru peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ) (Fig. 2B), a fost semnificativ crescut la nivelul aortelor șobolanilor obezi comparativ cu șobolanii normoponderali din lotul martor; efectul care a fost diminuat prin incubarea acută cu METF în cazul primului lot, dar nu și în cazul celui de-al doilea lot.

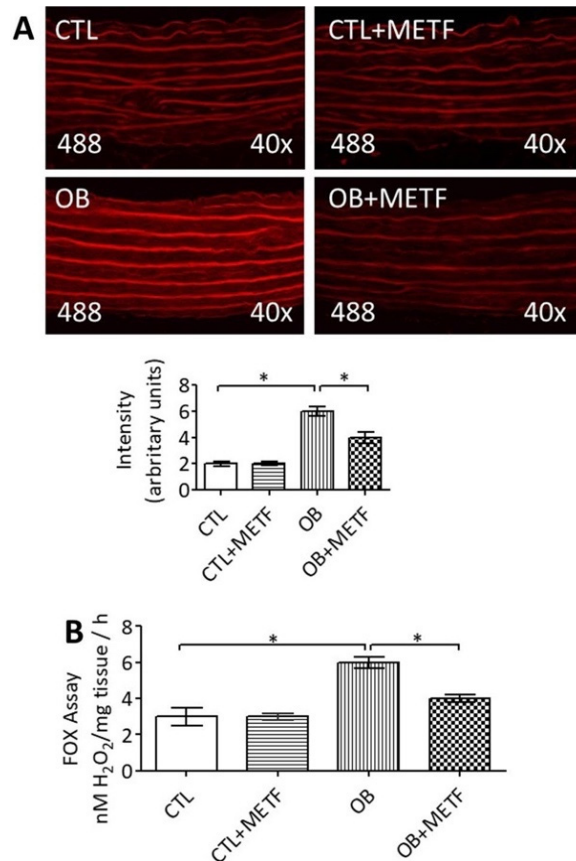


Figura 2. Metforminul a redus producția de SRO la nivelul aortelor izolate de la șobolani obezi (OB, n = 8) vs. șobolani non-obezi (CTL, n = 8). (A) Colorația DHE, (B) Tehnica FOX, \*p < 0.05

### 3. METFORMINUL A ATENUAT DISFUNCTIA ENDOTELIALĂ LA NIVELUL AORTELOR IZOLATE DE LA ȘOBOLANII CU OBEZITATE INDUSĂ PRIN DIETĂ

Evaluarea funcției vasomotorii a aortelor izolate a fost efectuată prin testarea răspunsului contractil al inelelor aortice la fenilefrină (Phe) și respectiv, relaxarea dependentă de endoteliu (RDE) la doze cumulative de acetilcolină (ACh). Contractilitatea vasculară a fost crescută și RDE a fost diminuată în cazul probelor vasculare provenite de la animalele obeze comparativ cu cele din lotul martor. Incubarea acută (12 ore) cu METF a preparatelor vasculare a condus în restabilirea contractilității vasculare și RDE și nu a avut niciun efect asupra funcției vasomotorii a inelelor aortice izolate de la animalele normoponderale (Fig. 3). Efectul benefic al METF la nivel vascular poate fi atribuit unei biodisponibilități crescute a oxidului nitric.

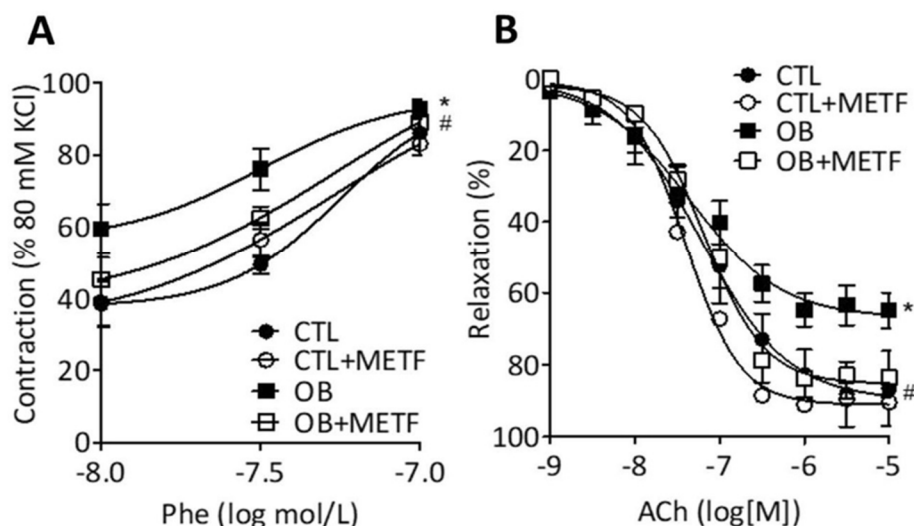


Figura 3. Metforminul îmbunătățește reactivitatea vasculară a inelelor aortice de la șobolanii obezi (OB, n = 8) vs cei normoponderali (CTL, n = 8). (A) Contractia indusă de Phe, (B) Relaxare dependentă de endotelu indusă de Ach.

#### 4. METFORMINUL A EXERCITAT EFECTE VASCULARE PROTECTOARE ÎN FAȚĂ DE STRESUL ACUT INDUS DE ANGIOTENSINA II, LIPOPOLIZAHARID ȘI GLUCOZĂ

Obezitatea a fost sistematic asociată cu inflamația, hipertensiunea arterială și hiperglicemia, izolat sau în asocierie în cadrul sindromului metabolic. Pentru a reproduce aceste efecte *in vitro*, a fost evaluat efectul acut (12 h) al METF asupra inelelor aortice de șobolan incubate cu angiotensină II (AII, 100 nM), lipopolizaharid (LPS, 1 µg/mL) sau o concentrație mare de glucoză (GLUC, 400 mg/dL). METF a îmbunătățit relaxarea vasculară, a atenuat stresul oxidativ și a redus expresia MAO care a fost crescută în condițiile incubării cu AII, LPS și GLUC.

### III. STUDIUL 2. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTULUI ANTIOXIDANT ACUT AL METFORMINULUI LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL IZOLAT DE LA PACIENȚII CARDIACI SUPRAPONDERALI, NON-DIABETICI

Există relativ puține date în literatura de specialitate cu privire la efectul acut al dozelor mici (micromolare) de METF la nivelul probelor tisulare umane. Ca atare am efectuat un studiu pilot pe 20 de pacienți cardiaci supraponderali, non-diabetici, cu un indice de masă corporală (IMC) de  $27,21 \pm 0,96$  kg/m<sup>2</sup>, diagnosticați cu IC-FEUR (FEVS =  $47,10 \pm 1,59\%$ ) și care au fost supuși chirurgiei cardiace electiv.

Ipoteza de lucru a celui de-al doilea studiu a fost că METF poate atenua stresul oxidativ atrial atunci când este aplicat acut *ex vivo* (10 µM, 12 h) la nivelul probelor de auricul drept prelevate de la pacienți supraponderali, non-diabetici, chiar și în prezența unor factori de stres suplimentar, prin incubarea cu AII, LPS și glucoză în cantitate crescută.

## 1. METFORMINUL A ATENUAT STRESUL OXIDATIV ACUT LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL UMAN

Stresul oxidativ a fost evaluat cu ajutorul markerului fluorescent DHE (Fig. 3) și a tehnicii FOX (Fig. 4) pentru producția de anion superoxid și respectiv, de  $H_2O_2$ . Stresul oxidativ a fost semnificativ crescut în condițiile care au mimat activarea sistemului renină-angiotensină (AII), inflamația (LPS) și hiperglicemia necontrolată (GLUC). METF a atenuat semnificativ stresul oxidativ atât la nivelul probelor atriale umane stimulate, cât și la cele de control (nestimulate), confirmând efectul benefic al medicamentului în atenuarea acută a stresului oxidativ cardiac, indiferent de severitatea acestuia.

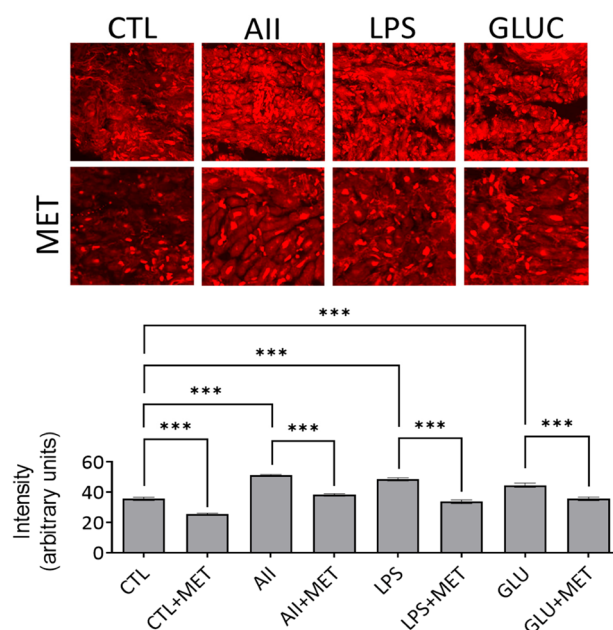


Figura 3. Metforminul a atenuat stresul oxidativ evaluat cu ajutorul markerului fluorescent DHE la nivelul probele atriale stimulate (CTL +AII, LPS, GLUC) și nestimulate (CTL). n = 20, \*\*\* p < 0,001

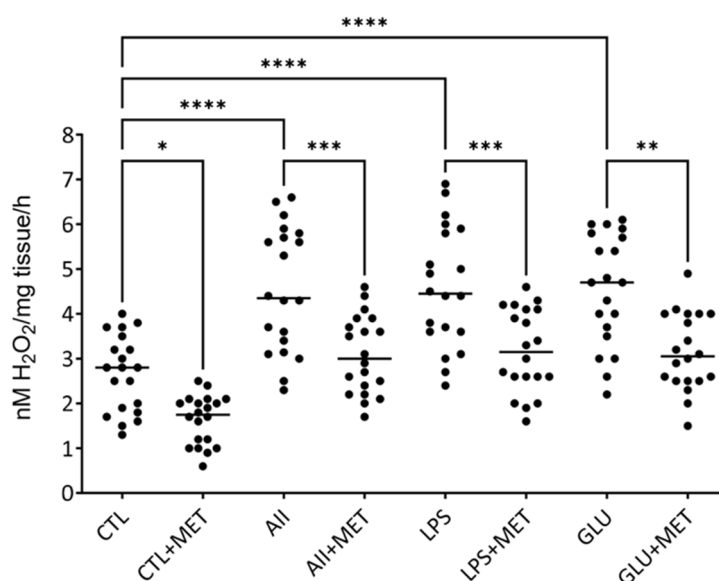


Figura 4. Metforminul a atenuat stresul oxidativ evaluat prin tehnica FOX la nivelul probelor atriale stimulate (CTL+AII, LPS, GLUC) și nestimulate (CTL). n = 20, \* p < 0,1, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001

## 2. STRESUL OXIDATIV ATRIAL SE CORELEAZĂ CU PARAMETRII ECOCARDIOGRAFICI

A fost investigată totodată o posibilă corelație a stresului oxidativ (nivelul  $H_2O_2$  măsurat cu testul FOX) cu parametrii ecocardiografici. S-a constatat o corelație pozitivă între nivelul SRO și diametrul AS, diametrul telediastolic al VS și diametrul VD, precum și o corelație negativă între SRO și fracția de ejeție a VS.

## IV. STUDIUL 3. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTELOR PROTECTOARE ALE METFORMINULUI ȘI EMPAGLIFLOZINULUI ASUPRA MAO ȘI A STRESULUI OXIDATIV VASCULAR LA NIVELUL ARTERELOR MAMARE UMANE IZOLATE DE LA PACIENȚII CORONARIENI SUPRAPONDERALI, NON-DIABETICI

Antidiabeticele clasice și noi oferă protecție cardiovasculară, independent de controlul glicemiei, însă un număr relativ redus de studii în literatură au comparat efectele lor la nivelul probelor umane. Ca atare, cel de-al treilea studiu a evaluat efectul acut *ex vivo* al METF și EMPA asupra reactivității vasculare, expresiei MAO și a stresului oxidativ, la nivelul fragmentelor de arteră mamară internă prelevate de la pacienții cu boală coronariană care au fost supuși revascularizării. Ipoteza de lucru a fost că efectele lor protectoare vor fi aditive atunci când sunt antidiabeticele sunt aplicate în asociere *ex vivo* la nivelul inelelor vasculare incubate acut (12 h) cu angiotensină II (AII) și o concentrație mare de glucoză (GLUC).

Studiul a fost efectuat pe un lot pilot de pacienți ( $n=9$ ) supraponderali ( $IMC = 26,89 \pm 1,26$ ) și aveau IC-FEUR ( $FEVS = 46,87 \pm 2,82\%$ ).

### 1. METFORMINUL ȘI EMPAGLIFLOZINUL ADMINISTRATE ACUT EX VIVO AU AMELIORAT DISFUNȚIA ENDOTELIALĂ LA NIVELUL INELELOR DE ARTERĂ MAMARĂ UMANĂ

Efectele METF și / sau ale EMPA asupra relaxării dependente de endoteliu la doze cumulative de ACh au fost evaluate la nivelul inelelor de arteră mamară (Fig. 5).

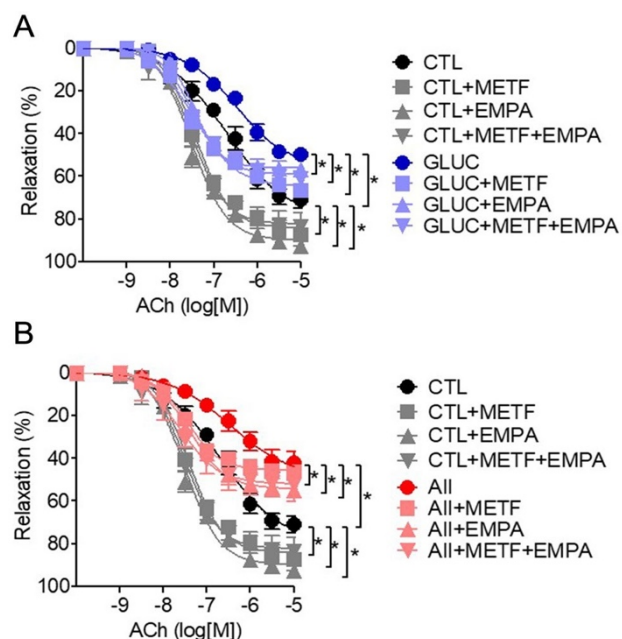


Figura 5. Efectele METF și EMPA (10  $\mu$ M) asupra funcției vasomotorii a arterelor mamare stimulate vs nonstimulate (CTL). A) Glucoză (GLUC, 400 mg/dL) și B) AII (100 nM);  $n = 9$ , \* $p < 0,05$



Expunerea acută la GLUC (Fig. 5A) sau AII (Fig. 5B) a determinat o scădere importantă a relaxării vasculare dependente de endoteliu. METF sau EMPA au atenuat RDE atât la nivelul inelelor de arteră mamară stimulate cu GLUC și AII, cât și a inelelor martor (CTL) nestimulate. Această din urmă observație este importantă deoarece demonstrează: i) faptul că afectarea vasculară este deja prezentă la pacienții supraponderali (non-obezi, non-diabetici) cu IC-FEUR și ii) prezența unei disfuncții endoteliale reversibile a unei artere utilizate pentru revascularizare, care poate fi atenuată prin expunerea acută la antidiabetice. De asemenea, aplicarea concomitentă acută *ex vivo* a METF și EMPA nu a avut un efect aditiv asupra îmbunătățirii reactivității vasculare a inelelor de arteră mamamară internă.

## 2. METFORMINUL ȘI EMPAGLIFLOZINUL ADMINISTRATE ACUT EX VIVO AU REDUS STRESUL OXIDATIV LA NIVELUL FRAGMENTELOR DE ARTERĂ MAMARĂ UMANĂ

Producția vasculară de SRO cunatificată folosind colorația cu DHE (Fig. 6A) și tehnica FOX (Fig.6B) a fost semnificativ crescută după stimularea acută cu GLUC sau AII.

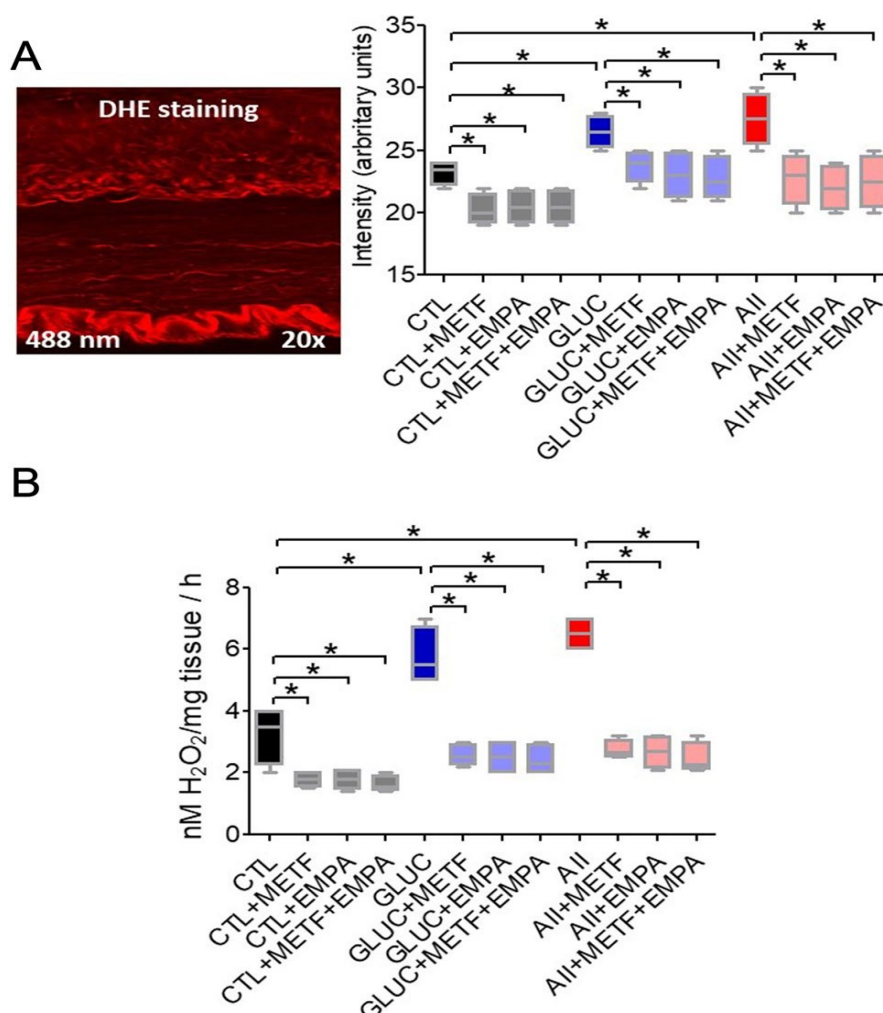


Figura 6. Efectele METF și EMPA asupra generării SRO în arterele mamare umane stimulate cu glucoză (GLUC, 400 mg / dL) și angiotensină II (AII, 100 nM). A. Colorația DHE; B. Tehnica FOX; n = 9, \*p < 0.05

Stresul oxidativ a fost atenuat prin coincubarea cu METF sau EMPA, dar fără a existat un efect cumulativ atunci când antidiabeticile au fost aplicate împreună (Fig.6). Important, ambele medicamente au fost capabile în mod independent să reducă producția de SRO a fragmentelor vasculare martor (nestimulate), indicând că stresul oxidativ este deja prezent (ca și disfuncția endotelială) la nivelul arterelor mamare interne utilizate pentru revascularizare la pacienții supraponderali, non-diabetici cu IC-FEUR.

### 3. METFORMINUL ȘI EMPAGLIFLOZINUL AU REDUS SUPRAEXPRESIA MAO-A ȘI B INDUSĂ DE EXPUNEREA LA GLUCOZĂ ȘI AII A ARTERELOR MAMARE INTERNE

Expresia proteică (imunofluorescență) și genică (qPCR) a MAO a fost evaluată la nivelul arterelor mamare interne. Ambele izoforme MAO-A și B au fost exprimate în mod egal (Fig. 7A) și a crescut semnificativ după stimularea cu GLUC și AII (Fig. 7B). În mod similar cu rezultatele privind stresul oxidativ, incubarea acută (12 h) cu METF sau EMPA a redus expresia MAO nu numai a vaselor tratate cu GLUC și AII, ci și a celor martor-CTL (Fig. 7B), iar co-administrarea antidiabeticelor nu e exercitat o protecție aditivă.

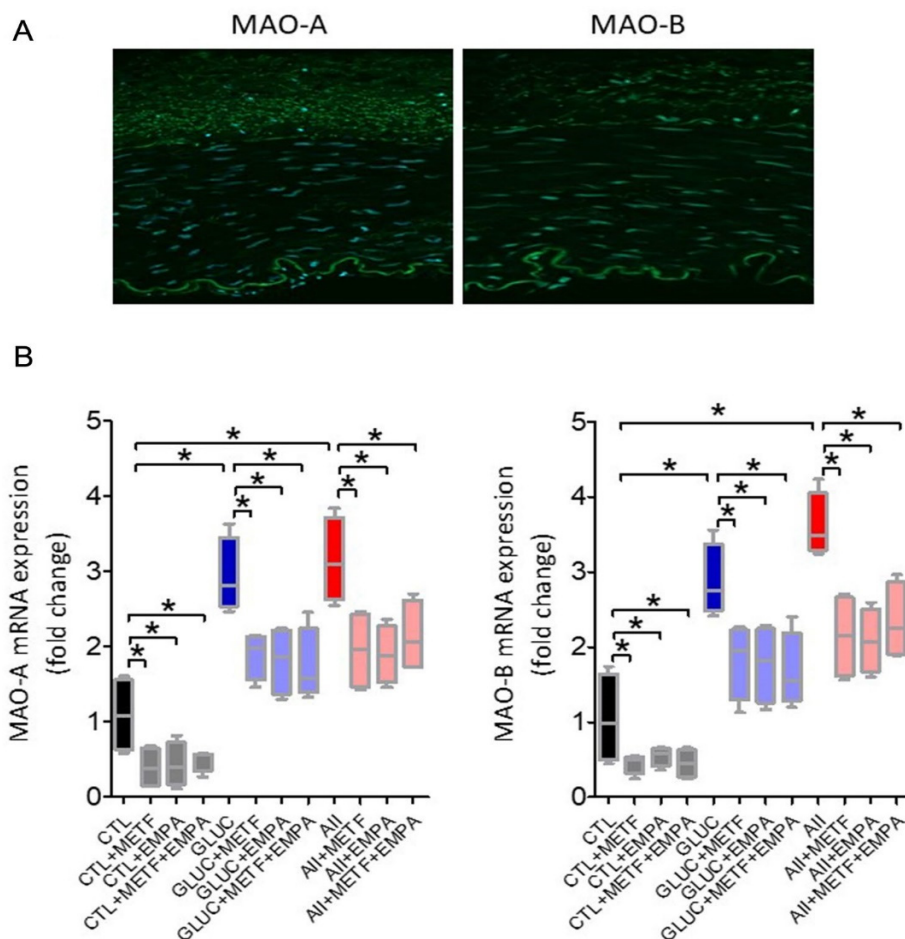


Figura 7. Efectul METF și EMPA asupra expresiei MAO în arterele mamare umane stimulate sau nu (CTL) cu GLUC (400 mg/dL) și AII (100 nM). A) Expresia proteică a MAO-A/B; B) Expresia genică/ARNm MAO-A/B; n = 9, \*p < 0.05

## V. STUDIUL 4. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA EFECTULUI PROTECTOR DE CLASĂ AL EMPAGLIFLOZINULUI ȘI DAPAGLIFOZINULUI ASUPRA MAO ȘI A STRESULUI OXIDATIV LA PACIENȚII CARDIACI SUPRAPONDERALI NON-DIABETICI

Cel de-al patrulea studiu a evaluat efectul protector de clasă al iSGLT2, respectiv dacă aplicarea *ex vivo* în concentrație relevantă din punct de vedere clinic, a EMPA și DAPA, reduce expresia MAO și ameliorează stresul oxidativ la nivelul probelor de auricul atrial drept prelevate de la pacienții supraponderali, non-diabetici, cu toate tipurile de IC supuși unei intervenții chirurgicale cardiace electiv. Studiul pilot a inclus 24 de pacienți non-diabetici, supraponderali (IMC =  $28,98 \pm 0,31$  kg/m<sup>2</sup>) și diagnosticați cu toate tipurile de IC (FE =  $43,47 \pm 11$ ).

### 1. EMPAGLIFLOZINUL ȘI DAPAGLIFLOZINUL AU DETERMINAT UN EFECT ANTIOXIDANT DEPENDENT DE CONCENTRAȚIE LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL UMAN

Probele atriale umane au fost incubate acut (12 h) *ex vivo* cu All (100 nM) și GLUC (400 mg/dL), în prezența vs absența a 2 doze (1 și 10 μM) de EMPA și DAPA. Cuantificarea SRO prin colorația cu DHE (Fig. 8) și tehnica FOX (Fig. 9) a reconfirmat stresul oxidativ indus de către ANG2 și GLUC au crescut, precum și reducerea dependentă de concentrație în cazul ambilor iSGLT2. De asemenea, ambele medicamente au redus producția de SRO și în cazul probele atriale martor (nestimulate cu GLUC sau ANG2), demonstrând prezența stresului oxidativ cardiac la pacienții supraponderali, non-diabetici.

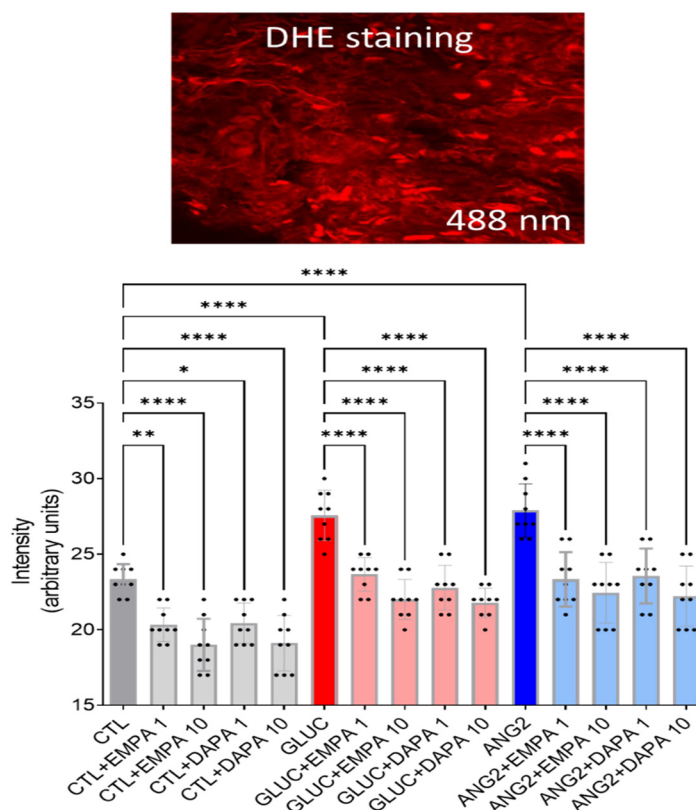


Figura 8. EMPA și DAPA (1, 10 μM) au atenuat stresul oxidativ în țesutul atrial uman – colorația cu DHE după incubarea cu GLUC și ANG2 (n=24) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001

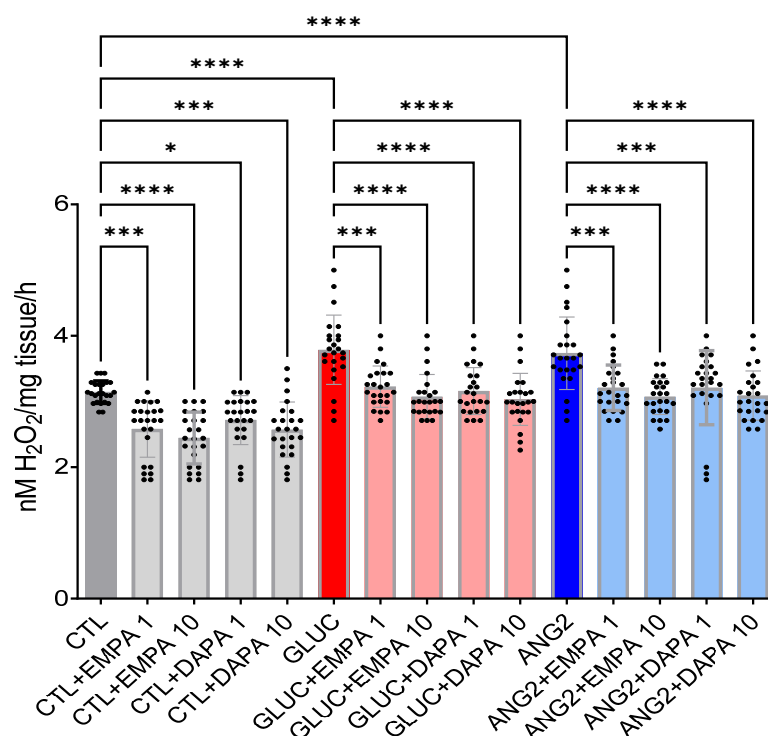


Figura 9. EMPA și DAPA (1, 10  $\mu$ M) au redus stresul oxidativ în țesutul atrial uman - tehnica FOX după incubarea cu All și GLUC (n=24) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001

Pentru a investiga mecanismele responsabile de efectul antioxidant al iSGLT2, am evaluat *ex vivo* proprietatea de scavenger a EMPA și DAPA. Comparativ cu catalaza, scavengerul clasic al SRO, aceștia au avut o capacitate antioxidantă directă mult redusă. Această observație sugerează indirect faptul că efectul iSGLT2 constă în modularea surselor intracelulare de SRO, mai degrabă decât reducerea directă a stresului oxidativ.

## 2. EMPAGLIFLOZINUL ȘI DAPAGLIFLOZINUL AU REDUS EXPRESIA MAO LA NIVELUL ȚESUTULUI ATRIAL UMAN

Ambele izoforme MAO sunt exprimate în țesutul atrial al pacienților supraponderali la nivel proteic (Fig. 10, imunofluorescență) și genic (Fig.11, ARNm, qPCR).

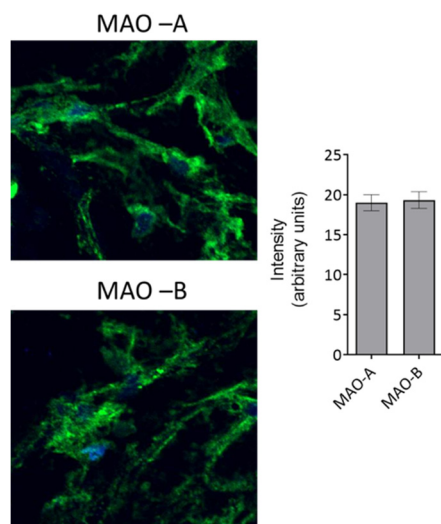


Figura 10. Expresia proteică a MAO-A și B la nivelul probelor atriale umane (20x, albastru = DAPI pentru nucleii, verde = MAO-A și B)

Incubarea acută cu EMPA sau DAPA a redus expresia MAO-A și B la nivelul probelor atriale stimulate cu ANG2 și GLUC (Fig. 9), confirmând efectul de clasă al iSGLT2. Ca și în cazul stresului oxidativ, efectul de reducere a fost observat și în cazul probelor martor (nestimate), ca dovadă a creșterii precoce a expresiei enzimatică la nivelul cordului pacienților supraponderali.

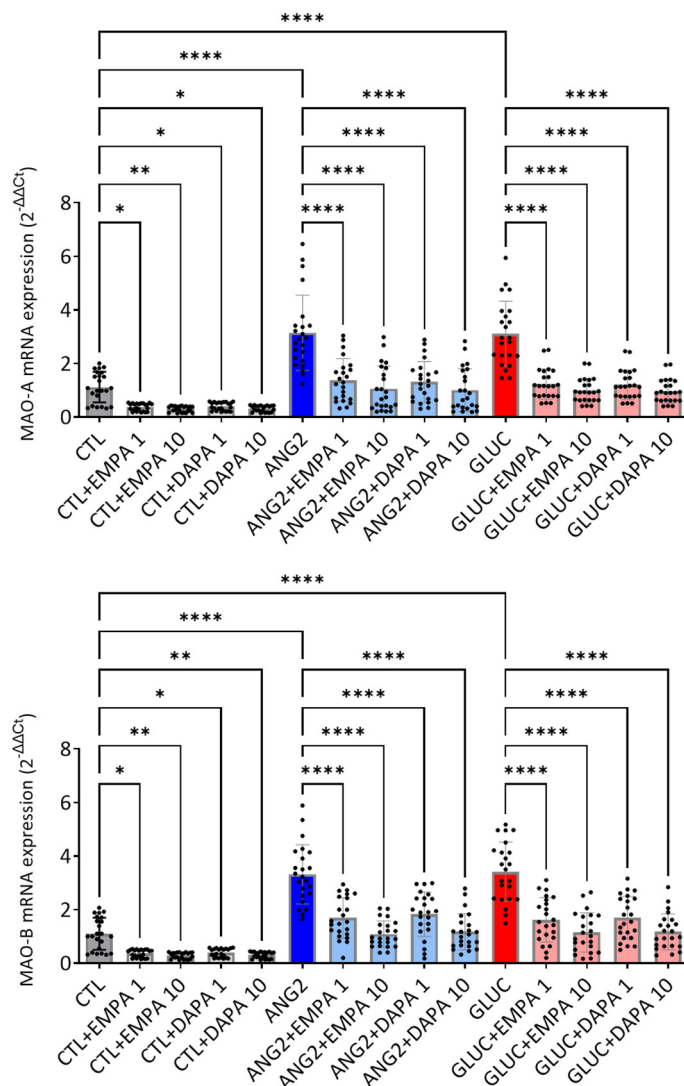


Figura 11. EMPA și DAPA au redus expresia genică (ARNm) a MAO-A și B după incubare cu ANG2 și GLUC (n=24) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001

### 3. STRESUL OXIDATIV S-A CORELAT SEMNIFICATIV CU PARAMETRII ECOCARDIOGRAFICI

Am investigat și la nivel cardiac corelațiile eventuale ale stresul oxidativ (nivelul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuantificat cu tehnica FOX) și parametrii ecocardiografici. Stresul oxidativ s-a corelat pozitiv cu diametrul AS (0,68), diametrul telediastolic al VS (0,56), volumul telediastolic al VS (0,51) și cu diametrul VD (0,46). În schimb, a fost observată o corelație negativă între SRO și fracția de ejeție a VS, cu un coeficient de corelație de -0,42.

## VI. CONCLUZII

1. Modelul experimental de obezitate indusă prin dietă la șobolan a determinat creșterea producției de specii reactive de oxigen la nivelul aortelor izolate de la animalelor obeze comparativ cu cele normoponderale.
2. Incubarea acută *ex vivo* a inelelor aortice izolate cu metformin a redus stresul oxidativ la lotul cu obezitate și nu a avut niciun efect la lotul martor.
3. La animalele obeze, contractilitatea vasculară a crescut, în timp ce relaxarea dependentă de endoteliu a fost redusă, drept markeri ai prezenței disfuncției endoteliale.
4. Metforminul, medicamentul de primă linie al DZ tip 2, a ameliorat disfuncția endotelială (a redus contractilitatea și a îmbunătățit relaxarea) la nivelul inelelor aortice izolate de la animalele obeze și nu a avut niciun efect asupra reactivității vasculare la nivelul celor de la lotul martor.
5. Metforminul a redus contracția indusă de L-NAME (inhibitorul clasic al sintetazei oxidului nitric), sugerând indirect că un posibil mecanism de protecție vasculară este biodisponibilitatea crescută a NO.
6. Ambele izoforme MAO-A și MAO-B au fost supraexprimate la nivelul fragmentelor aortice izolate de la șobolanii obezi (dar nu și de la cei normoponderali) și au contribuit la stresul oxidativ vascular.
7. Metforminul a redus expresia MAO la nivelul aortelor izolate de la șobolanii obezi și nu a avut niciun efect asupra enzimelor responsabile de generarea catecolaminelor vasculare.
8. La nivelul țesutului atrial prelevat de la pacienții cardiaci cu IC-FEUR supraponderali, non-diabetici, incubarea *ex vivo* cu angiotensină II, lipopolizaharid și glucoză în concentrație mare a fost urmată de o generare crescută de anion superoxid și peroxid de hidrogen.
9. Metforminul a exercitat un efect protector antioxidant acut în contextul stresului oxidativ indus *ex vivo* de condițiile care au mimat activarea sistemului renină-angiotensină, inflamația acută și diabetul necontrolat, precum și față de stresul oxidativ bazal prezent la nivelul probelor atriale nestimulate.
10. Magnitudinea stresului oxidativ atrial bazal s-a corelat pozitiv cu diametrul AS, diametrul telediastolic al VS și diametrul VD și negativ cu FEVS.
11. Stimularea acută *ex vivo* cu angiotensină II, lipopolizaharid și glucoză a determinat disfuncție endotelială și creșterea expresiei MAO la nivelul arterelor mamare interne prelevate de la pacienții coronarieni, supraponderali, non-diabetici, supuși intervenției de revascularizare.
12. Expunerea acută la metformin sau empagliflozin a îmbunătățit reactivitatea vasculară a probelor vasculare netratate și tratate, fără efect aditiv.
13. Expunerea acută la oricare dintre antidiabetice a redus expresia ambelor izoforme MAO, fără a obține un efect aditiv prin co-administrarea acestora.
14. Stimularea acută *ex vivo* cu angiotensină II și glucoză a crescut stresul oxidativ la nivelul țesutului atrial prelevat de la pacienții cardiaci supraponderali, non-diabetici, cu toate tipurile de IC cu indicație de chirurgie cardiacă.
15. Expunerea acută *ex vivo* a probelor cardiace umane la dapagliflozin și empagliflozin a determinat un efect antioxidant dependent de concentrație.

16. Efectul protector antioxidant al iSGLT2 a fost prezent și la nivelul probelor martor (nestimulate cu All sau glucoză), demonstrând prezența stresului oxidativ atrial bazal la pacienții supraponderali, non-diabetici cu insuficiență cardiacă.
17. Ambele izoforme MAO-A și MAO-B, sunt exprimate la nivelul țesutului atrial uman prelevat de la pacienții supraponderali, non-diabetici cu insuficiență cardiacă.
18. Expunerea acută *ex vivo* la empagliflozin și dapagliflozin a redus expresia genică a MAO-A și MAO-B care a crescut în urma stimulării cu All și glucoză.
19. Inhibitorii SGLT2 nu exercită un efect antioxidant de tip scavenger ci prin modulare (mai multor) surse intracelulare de SRO, una dintre acestea fiind MAO – drept nou efect de tip "off-target" al acestei clase.

#### CONTRIBUȚII ORIGINALE:

- Caracterizarea efectului protector al metforminului de ameliorare a disfuncției endoteliale și scăderea expresiei MAO vasculare și a producției de SRO la nivelul probelor aortice izolate de la șobolani cu obezitate indusă prin dietă;
- Demonstrarea efectului antioxidant acut al METF la nivelul țesutului atrial de la pacienții supraponderali, non-diabetici, supuși intervențiilor pe cord deschis;
- Demonstrarea creșterii MAO după stimularea acută cu All și glucoză la nivelul arterelor mamare umane și capacitatea METF și EMPA de a reduce stresul oxidativ și disfuncția endotelială;
- Demonstrarea contribuției MAO la stresul oxidativ atrial uman în condiții bazale și la stimularea acută cu All și glucoză, precum și capacitatea EMPA și DAPA de a-l contracara, ca nou efect de clasă de tip "off-target" al iSGLT2.

#### DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE:

- Investigarea căilor de semnalizare intracelulare care stau la baza interacțiunii metformin - MAO la pacienții supraponderali/obezi cu insuficiență cardiacă.
- Investigarea mecanismelor de semnalizarea intracelulară responsabile de efectul antioxidant benefic al inhibitorilor SGLT2 la acești pacienți.

### VII. PUBLICAȚII ȘTIINȚIFICE

1. Ionică LN, Lința AV, Bătrîn AD, Hâncu IM, Lolescu BM, Dănilă MD, Petrescu L, Mozoș IM, Sturza A, Muntean DM. *The Off-Target Cardioprotective Mechanisms of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: An Overview. International Journal of Molecular Sciences* **2024**; 25(14):7711. (FI – 4.9)
2. Ionică LN, Buriman DG, Lința AV, Șoșdean R, Lascu A, Streian CG, Feier HB, Petrescu L, Mozoș IM, Sturza A, Muntean DM. *Empagliflozin and Dapagliflozin Decreased Atrial Monoamine Oxidase Expression and Alleviated Oxidative Stress in Overweight Non-Diabetic Cardiac Patients. Mol Cell Biochem* **2024** Jul 23.doi: 10.1007/s11010-024-05076-z. (FI – 3.5)
3. Ionică LN, Gaiță L, Bîcă AM, Șoșdean R, Lighezan R, Sima A, Malița D, O. Crețu, O. Burlacu, DM. Muntean, A. Sturza. *Metformin Alleviates Monoamine Oxidase-Related Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction In Rats With Diet-Induced Obesity. Mol Cell Biochem* **2021**; 476(11): 4019-4029. ISI Journal (FI – 3.8)
4. Lascu A, Ionică LN, Merce AP, Dănilă MD, Petrescu L, Sturza A, Muntean DM, Streian CG. *Metformin Acutely Mitigates Oxidative Stress in Human Atrial Tissue: A Pilot Study in Overweight Non-Diabetic Cardiac Patients. Life* **2022**, 12(12), 2058. doi.org/10.3390/life12122058. (FI – 3.2)
5. Lascu A, Ionică LN, Buriman DG, Merce AP, Deaconu L, Borza C, Crețu OM, Sturza A, Muntean DM, Feier HB. *Metformin and Empagliflozin Modulate Monoamine Oxidase-related Oxidative Stress and Improve Vascular Function in Human Mammary Arteries. Mol Cell Biochem* **2023**;478(9):1939-1947. doi.10.1007/s11010-022-04633-8. (FI – 3.5)