
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Heterogenitatea obezității și a rezistenței la insulină: clinico-antropometrică, metabolică și metabolomică

Doctorand **Andrada-Alina Oltean (căs. Mureșan)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Gabriela Roman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Obezitatea o mare provocare pentru medicină și societate	19
1.1. Definiție	19
1.2. Impactul obezității	19
1.2.1. Impactul epidemiologic	19
1.2.2. Impactul clinic	20
1.2.3. Impactul terapeutic	21
1.2.4. Impactul economic	21
2. Obezitatea o boală heterogenă multisistemică	23
2.1. Patogeneză	23
2.1.1. Disfuncția inflamatorie și adipokinică	23
2.1.2. Insulinorezistența	25
2.1.3. Depozitarea ectopică a țesutului adipos	26
2.1.4. Microbiota intestinală	26
2.2. Heterogenitatea obezității	27
3. Obezitatea și metabolomica	33
3.1. Introducere	33
3.2. Metabolomica și importanța clinică	35
3.3. Metabolomica și heterogenitatea obezității	36
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	43
2. Metodologie generală	45
2.1. Considerente etice	45
2.2. Măsurătorile antropometrice și analiza corporală	45
2.3. Determinări biochimice	48
2.4. Determinarea hormonilor, miokinei și a hs-CRP	48
2.5. Analiza metabolomică	48
2.6. Analiza statistică	50
3. Studiu 1. Asocierea indicilor aterogeni cu fenotipul obezității metabolic nesănătoase	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru	52
3.3. Material și metodă	52

3.3.1. Participanții	52
3.3.2. Protocolul studiului	52
3.3.3. Analiza statistică	53
3.4. Rezultate	53
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	58
4. Studiu 2. Influența obezității asupra nivelurilor circulante de irisină	59
4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru	60
4.3. Material și metodă	60
4.3.1. Participanții	60
4.3.2. Protocolul studiului	61
4.3.3. Analiza statistică	61
4.4. Rezultate	62
4.5. Discuții	64
4.6. Concluzii	66
5. Studiu 3. Aminoacizii circulanți – markeri ai adipozității viscerale independenți de insulinorezistență: o cercetare metabolomică țintită	67
5.1. Introducere	67
5.2. Ipoteza de lucru	68
5.3. Material și metodă	68
5.3.1. Participanții	68
5.3.2. Protocolul studiului	68
5.3.3. Măsurarea nivelurilor serice ale aminoacizilor	69
5.3.4. Analiza statistică	69
5.4. Rezultate	70
5.4.1. Date clinice și paraclinice ale participanților	70
5.4.2. Identificarea aminoacizilor în funcție de aria grăsimii viscerale	71
5.4.3. Analiza căilor metabolice	77
5.4.4. Asocierea ariei grăsimii viscerale cu aminoacizii identificați – influența insulinorezistenței	79
5.5. Discuții	79
5.6. Concluzii	82
6. Studiu 4. Analiza metabolomică la persoanele normopondere, obezitate metabolic sănătoasă și nesănătoasă: modificările aminoacizilor în evoluția metabolică	83
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteza de lucru	83

6.3. Material și metodă	84
6.3.1. Participanții	84
6.3.2. Protocolul studiului	84
6.3.3. Măsurarea nivelurilor serice ale aminoacizilor	84
6.3.4. Analiza statistică	85
6.4. Rezultate	85
6.5. Discuții	93
6.6. Concluzii	96
7. Concluzii generale	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99

REFERINȚE	101
------------------	-----

Cuvinte cheie: obezitate, metabolomică țintită, insulinorezistență, biomarkeri, irisina.

INTRODUCERE

Obezitatea este o boală cronică, epidemică, complexă, recidivantă și heterogenă, fiind asociată cu multiple comorbidități și mortalitate crescută, ceea ce o situează ca o problemă majoră de sănătate publică cu implicații socio-economice deosebite. Complexitatea și heterogenitatea obezității precum și evoluția cronică, recidivantă, impun o intervenție multifactorială, multidisciplinară și de lungă durată. Managementul obezității trebuie individualizat și adaptat fiecărei persoane, iar obiectivele intervenției terapeutice sunt: scăderea ponderală, menținerea acesteia, prevenirea recăștigului ponderal, controlul comorbidităților și reducerea riscului global.

Patogeneza obezității este legată de trei mecanisme principale: disfuncția inflamatorie și adipokinică a țesutului adipos, insulinorezistența și depozitarea ectopică a țesutului adipos.

Tabloul clinic al persoanelor cu obezitate este dominat de comorbidități, cele mai frecvente fiind metabolice (diabet zaharat tip 2, dislipidemia, steatoza hepatică sau statohepatita non-alcoolică), hipertensiunea arterială, bolile cardiovasculare, oncologice, osteo-articulare și apneea obstructivă în somn.

Metabolomica a condus la identificarea unui număr mare de metaboliți care sunt asociați cu multiple patologii, printre care și obezitatea, iar în unele cazuri aceștia au posibilitatea de a prezice dezvoltarea unei boli sau rezultatele intervențiilor specifice. Fenotipizarea precisă cu ajutorul metabolomicii reprezintă un potențial pentru aplicarea ei în practica medicală de către clinician, pentru o medicină precisă și recomandări individualizate. Heterogenitatea obezității din punct de vedere a metabolomicii este explicată prin diferențele nivelurilor de aminoacizi (AA) în distribuția țesutului adipos, diferențele între sexe și fenotipurile obezității asociate cu riscul cardiovascular.

În concluzie, metabolomica oferă posibilități suplimentare de caracterizare a fenotipurilor obezității, și prin aceasta deschide calea spre terapia individualizată.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Partea generală a tezei de doctorat este formată din trei capitole. În aceste capitole sunt prezentate succint datele cele mai importante și de noutate din literatura de specialitate referitoare la obezitate, heterogenitatea multisistemică a acesteia și tehnica metabolomicii în obezitate.

În primul capitol, se descrie succint impactul obezității din punct de vedere epidemiologic, clinic, terapeutic și economic.

În al doilea capitol, Obezitatea o boală heterogenă multisistemică, se prezintă succint date despre patogeniza și mecanismele implicate în această patologie complexă.

Cel de-al treilea capitol, denumit Obezitatea și metabolomica, sunt prezentate sumar tehnicile metabolomice și tipurile, precum și importanța acestora în heterogenitatea obezității.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea a doua a tezei de doctorat este formată din ipoteza de lucru, metodologia generală, patru studii de cercetare, concluzii generale și contribuțiile inovative ale tezei de doctorat.

Studiul 1. Asocierea indicilor aterogeni cu fenotipul obezității metabolic nesănătoase

Introducere: Este bine cunoscut faptul că obezitatea reprezintă un factor de risc independent pentru apariția diabetului zaharat tip 2 și a bolilor cardiovasculare. Studiile au evidențiat diferite tipuri de obezitate din punct de vedere metabolic: fenotipul obezității metabolic sănătoase (ObMS) și nesănătoase (ObMNS). Persoanele care se încadrează în prima categorie sunt considerate că au un risc mai scăzut de complicații cardiometabolice, iar persoanele nesănătoase din punct de vedere metabolic prezintă risc crescut de mortalitate de orice cauză și evenimente cardiovasculare. În literatură sunt descriși mai mulți inidii/parametrii pentru fi utilizați în practica clinică și pentru a estima riscul cardiovascular. Acești ar putea ajuta clinicianul în predicția riscului cardiovascular la persoanele cu obezitate în funcție de fenotipul specific.

Ipoteza de lucru: Pentru o mai bună fenotipizare a obezității, s-au studiat diferiți indici pentru a estima riscul cardiovascular. Scopul acestui studiu a fost de a compara indicii aterogeni (produsul de acumulare al lipidelor (PAL), indicele aterogen, raportul non HDL colesterol/HDL colesterol, LDL colesterol/HDL colesterol și talia hipertensivă) din fenotipurile obezității, și de a evalua asocierea lor cu fenotipul metabolic nesănătos.

Material și metodă: Studiul a fost unul retrospectiv, observațional, în care au fost colectate datele de la pacienții care s-au prezentat pentru evaluare și recomandări nutriționale în Clinica privată "Regina Maria", Cluj-Napoca. Au fost incluși în studiu 163 de persoane cu obezitate, iar din fișele medicale de observație ale pacienților, au fost colectate date antropometrice, biochimice și date despre analiza corporală realizată prin bioimpedanță electrică. Pacienții au fost împărțiți în două loturi în funcție de criteriile sindromului metabolic (SM): ObMNS (IMC ≥ 30 kg/m² și prezența SM), ObMS (IMC ≥ 30 kg/m² și absența criteriilor SM).

Rezultate: Din întreg lotul de persoane incluse, 72,4% au fost încadrate în fenotipul de obezitate metabolic nesănătoasă. În funcție de fenotipul obezității, femeile sunt în majoritate caracterizate de fenotipul ObMS. Din punct de vedere al compoziției corporale, se evidențiază diferențe semnificativ statistice privind aria grăsimii viscerale și masa musculară scheletică, care sunt crescute la persoanele cu ObMNS. Istoricul medical al persoanelor incluse este dominat de prezența semnificativ crescută a dislipidemie și a taliei hipertensive la persoanele cu ObMNS. Toți indicii aterogeni studiați au fost semnificativ crescuți în lotul persoanelor cu obezitate metabolic nesănătoasă. În analiza regresiei logistice neajustată, rezultatele au fost asociate semnificativ statistic ($p < 0,05$) cu toți indicii cercetați în ObMNS. De asemenea, aceștia au rămas asociați ($p < 0,05$) cu ObMNS și după ajustările în funcție de sex, vârstă, aria grăsimii viscerale și indicele de insulinorezistență HOMA-IR.

Concluzii: În acest studiu am descris mai mulți indici aterogeni, accesibili în practica medicală care pot ajuta clinicianul să identifice fenotipul persoanelor cu obezitate metabolic nesănătoasă, și să estimeze riscul cardiovascular asociat pentru a aplica măsurile de prevenție specifice.

Studiul 2. Influența obezității asupra nivelurilor circulante de irisină

Introducere: Irisina este o adipomiokină termogenă produsă în principal de mușchiul scheletic și țesutul adipos prin scindarea fibronectinei de tip III. Irisina joacă un rol cheie în homeostazia glucozei și este implicată în procesul de termogeneză prin stimularea conversiei țesutului adipos alb în țesut adipos brun. Principalele efecte metabolice atribuite irisinei sunt reducerea rezistenței hepatice la insulină, a glucozei serice, inhibarea glucogenezei și stimularea glicogenezei. Totuși, studiile raportează modificări ale nivelurilor de irisină la persoanele cu obezitate.

Ipoteza de lucru: Dovezile privind rolul irisinei, o moleculă recent descoperită, în rezistența la insulină și inflamație, sunt limitate și controversate, iar mecanismele dintre ele rămân necunoscute.

Material și metodă: Acesta a fost un studiu transversal efectuat în Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice, Spitalul Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca și Clinica „Regina Maria” Cluj-Napoca. Studiul a inclus 20 de femei, sănătoase din punct de vedere clinic, cu o greutate normală, și 22 femei cu obezitate (IMC ≥ 30 kg/m²), care s-au prezentat pentru recomandări nutriționale privind un stil de viață sănătos sau pentru scăderea ponderală. Perioada de înrolare a fost cuprinsă între mai 2017 și aprilie 2021. Au fost consemnate datele demografice prin anamneză, examen clinic și

prelevare de probe biologice (glucoza serică, profilul lipidic, creatinina, transaminazele, insulinemia, proteina C reactivă înalt sensibilă hs-PCR, irisina și adiponectina). Analiza compoziției corporale a fost efectuată prin bioimpedanță electrică.

Rezultate: Lotul cu obezitate a avut niveluri semnificativ crescute de irisină în comparație cu cel cu normopondere. De asemenea, hs-PCR și HOMA-IR au fost semnificativ mai mari la participanții cu obezitate decât la cei cu IMC normal. Nu s-a observat nicio diferență între loturi privind vârsta, colesterolul total, trigliceridele, nivelul transaminazelor hepatice, creatina și adiponectina. Irisina a fost corelată semnificativ cu IMC, țesutul adipos total, țesutul adipos de la nivelul trunchiului și al membrelor, hs-PCR și HOMA-IR. În analiza de regresie liniară univariată neajustată, Lg irisina a fost asociată cu IMC, țesutul adipos total, țesutul adipos de la nivelul trunchiului și al membrelor, hs-PCR și HOMA-IR. Nu s-a observat nicio asociere cu adiponectina. După ajustarea pentru țesutul adipos total și vârstă, irisina a rămas asociată cu hsCRP ($\beta=0,378$, $p=0,002$). Nu a fost observată nicio asociere după ajustarea în funcție de adiponectină și HOMA-IR.

Concluzii: Nivelurile de irisină circulante au fost mai crescute la femeile cu obezitate în comparație cu cele normoponderale. Relația dintre nivelurile circulante de irisină și rezistența la insulină a fost mediată de țesutul adipos total. Niveluri mai ridicate de irisină au fost asociate cu inflamația subclinică sistemică, evaluată prin hs-PCR, sugerând că acestea pot fi implicate în inflamația din obezitate.

Studiul 3. Aminoacizii circulanți – markeri ai adipozității viscerale independenți de insulinorezistență: o cercetare metabolomică țintită

Introducere: Noile tehnologii emergente, precum metabolomică țintită, au permis identificarea unor biomarkeri asociați cu obezitatea, dar și ai unora care sunt predictivi pentru tulburările metabolice asociate acestei patologii. Acestea au furnizat informații utile și despre căile moleculare implicate în obezitate. Deoarece aminoacizii acționează ca modulatori metabolici, dar și ca substrat pentru sinteza proteinelor, aceștia au fost studiați pe larg în obezitate.

Ipoteza de lucru: Având în vedere că aminoacizii identificați în adipozitatea viscerală au fost asociați cu insulinorezistența, în acest studiu am urmărit nivelurile AA și modificările specifice ale acestora ca amprentă a adipozității viscerale crescute, la un lot de femei clinic sănătoase.

Material și metodă: Acesta este un studiu transversal realizat în perioada mai 2017 - aprilie 2021 în Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice, Spitalul Clinic de Urgență, Cluj-Napoca și Clinica privată "Regina Maria", Cluj-Napoca. Am inclus consecutiv 42 femei adulte sănătoase, cu o greutate normală ($IMC 18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$) sau obezitate ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Au fost consemnate datele demografice prin anamneză, examen clinic și prelevare de probe biologice, iar analiza compoziției corporale a fost efectuată prin bioimpedanță electrică. Persoanele au fost împărțite în două loturi în funcție de aria grăsimii viscerale ($AGV \geq 100 \text{ cm}^2$ și $AGV < 100 \text{ cm}^2$), iar aminoacizii studiați au fost identificați prin tehnica metabolomicii țintite.

Rezultate: Compararea grupurilor cu $AGV \geq 100 \text{ cm}^2$ și $< 100 \text{ cm}^2$ a evidențiat faptul că 13 AA au fost semnificativ diferiți între loturile studiate. Grupul cu $AGV \geq 100 \text{ cm}^2$ a prezentat niveluri mai ridicate de AA esențiali (valină, izoleucină, metionină, fenilalanină, triptofan, lizină, histidină), AA condițional esențiali și neesențiali (prolină, tirozină, alanină, cisteină, serină) și niveluri semnificativ mai scăzute de glicină (AA neesențial) în comparație cu femeile din grupul $AGV < 100 \text{ cm}^2$. Prin analiza PLS-DA s-au identificat 5 metaboliți cu importanță variabilă în scorurile $VIP > 1$ și, prin urmare, cu variații semnificative între grupuri: tirozina, prolina, glicina, cisteina și izoleucina. Pentru analiza căilor, am cartografiat căile metabolice corelate cu cei 5 metaboliți. Am identificat 17 căi de metabolizare la compararea grupurilor, cu o valoare p corectată de $FDR < 0,05$. Dintre acestea, 5 căi metabolice au avut scoruri de impact $\geq 0,1$: căile de metabolizare a fenilalaninei, tirozinei și biosinteza triptofanului; metabolismul tirozinei; metabolismul glicinei, serinei și treoninei; metabolismul glicoxilatului și dicarboxilatului; metabolismul cisteinei și metioninei. Am efectuat o regresie liniară ajustată pentru HOMA-IR, iar toți AA incluși în această analiză au fost asociați cu AGV independent de HOMA-IR (valoarea p pentru toți coeficienții de regresie $< 0,05$) și majoritatea asocierilor au fost pozitive, cu excepția glicinei care a fost invers asociată cu AGV.

Concluzii: În acest studiu, am identificat 5 aminoacizi care au fost asociați cu aria grăsimii viscerale independent de indicii de rezistență la insulină. Aceștia ar putea fi considerați ca viitori biomarkeri ai țesutului adipos visceral crescut.

Studiul 4. Analiza metabolomică la persoanele cu normopondere, obezitate metabolic sănătoasă și nesănătoasă: modificările aminoacizilor în evoluția metabolică

Introducere: Obezitatea este o patologie complexă și heterogenă, cu mai multe fenotipuri descrise în literatură. Datorită manifestărilor clinice ale obezității, care sunt heterogene și complexe, dar și faptului că nu există o definiție clară a ObMS, prevalența acestui subtip de obezitate descris în literatură variază. Prin urmare, cercetările recente privind obezitatea au investigat biomarkerii implicați în această patologie, în special nivelurile AA prin tehnica metabolomicii țintite.

Ipoteza de lucru: Scopul acestei cercetări a fost de a investiga modificările concentrațiilor serice ale AA ca markeri ai modificărilor metabolice la persoanele cu obezitate metabolic sănătoasă, respectiv nesănătoasă comparativ cu persoanele normoponderale. Prin urmare, o abordare metabolomică țintită care vizează căile metabolice este importantă pentru o înțelegere și aprofundare mai detaliată a heterogenității în obezitate, dar și a implicațiilor clinice în ObMS.

Material și metodă: Studiul de față a fost unul transversal, realizat în perioada mai 2017 – aprilie 2021 în Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice, Spitalul Clinic de Urgență, Cluj-Napoca și Clinica privată "Regina Maria", Cluj-Napoca. Am înrolat 70 de femei adulte împărțite în 3 grupuri. Lotul martor, femei cu normopondere ($IMC 18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$), lotul cu ObMS reprezentat prin $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ fără prezența sindromului metabolic, și lotul cu ObMNS reprezentat prin $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ și prezența

diabetului zaharat tip 2 insulinotratat. Au fost consemnate datele demografice prin anamneză, examen clinic și prelevare de probe biologice, iar aminoacizii au fost identificați prin tehnica metabolomicii țintite.

Rezultate: Pacientele cu ObMNS au avut un IMC mai mare comparativ cu lotul de ObMS și cel cu normopondere. Pacientele cu ObMNS au fost mai în vârstă, cu glicemii bazele mai mari și trigliceride crescute. Nu s-au evidențiat diferențe semnificativ statistic privind valorile colesterolului total. Au fost identificați 12 AA cu tendințe diferite semnificativ statistic între grupuri studiate. Folosind modelul PLS-DA, 5 AA au avut variație semnificativă între loturi. Lizina este semnificativ crescută în loturile cu normopondere și ObMS, comparativ cu cei din lotul cu ObMNS ($p < 0,05$). Nivelurile cisteinei au crescut în paralel cu deteriorarea statusului metabolic, având cel mai scăzut nivel în lotul cu normopondere și cel mai crescut în grupul ObMNS ($p < 0,001$ pentru comparații între grupuri). Asparagina și glutamina au avut concentrații similare în grupurile cu normopondere și ObMS ($p > 0,05$), comparativ cu lotul ObMNS. Asparagina a fost semnificativ mai mică în aceste grupuri, în timp ce glutamina a fost semnificativ mai crescută în aceste loturi ($p < 0,05$ pentru aceste comparații). Valorile metioninei, au fost mai crescute în lotul cu ObMS, comparativ cu ObMNS.

Concluzii: Valorile celor 5 aminoacizi identificați ar putea fi utilizate pentru a evalua statusul metabolic la persoanele cu obezitate, atât la evaluare inițială, dar și în timpul monitorizării efectelor intervențiilor terapeutice.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Lucrarea de față, ce reprezintă o analiza extensivă a heterogenității obezității, este prima din țara noastră care a abordat această temă, iar studiile cuprinse în cadrul cercetării personale sunt primele care au evaluat obezitatea din punct de vedere al metabolomicii țintite. În ultimii ani, această tehnică este folosită pentru a studia mecanismele fiziopatologice implicate în această patologie, dar și în fenotipizarea persoanelor cu obezitate. Informațiile obținute prin metabolomică sunt și vor fi utile în practica clinică a medicinei precise. Medicina de precizie este un concept care implică măsuri preventive, diagnostice și de tratament personalizat, pentru a eficientiza la maxim tratamentul. Pentru a atinge aceste obiective, cercetările s-au axat pe identificarea unor biomarkeri prin tehnici moderne precum metabolomică țintită. Recunoașterea și caracterizarea unor metaboliților, precum aminoacizii, aduc un plus de informații pentru a caracteriza fenotipurile obezității.

Contribuția inovativă a tezei constă în creșterea vizibilității acestor potențial biomarkeri, care ar putea fi utilizați în practica clinică pentru o fenotipizare mai precisă a persoanelor cu obezitate și implicit în efectuarea unor recomandări personalizate de tratament.

Această teză aduce dovezi suplimentare ale existenței unei heterogenități clinico-antropometrice, metabolice și metabolomice cu implicații importante în modul de abordare a persoanelor cu obezitate: screening, evaluare, intervenție terapeutică personalizată și monitorizare.

PHD THESIS SUMMARY

Heterogeneity of obesity and insulin resistance: clinico-anthropometric, metabolic and metabolomics

PhD student **Andrada-Alina Oltean (Mureșan)**

PhD supervisor **Prof. Dr. Gabriela Roman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of Contents

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Obesity is a major challenge for medicine and society	19
1.1. Definition	19
1.2. The impact of obesity	19
1.2.1. Epidemiological impact	19
1.2.2. Clinical impact	20
1.2.3. Therapeutic impact	21
1.2.4. Economic impact	21
2. Obesity is a heterogeneous and multisystemic disease	23
2.1. Pathogenesis	23
2.1.1. Inflammatory and adipokinic dysfunction	23
2.1.2. Insulin resistance	25
2.1.3. Ectopic storage of adipose tissue	26
2.1.4. Intestinal microbiota	26
2.2. Heterogeneity of obesity	27
3. Obesity and metabolomics	33
3.1. Introduction	33
3.2. Metabolomics and its clinical significance	35
3.3. Metabolomics and the heterogeneity of obesity	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis	43
2. General methodology	45
2.1. Ethical considerations	45
2.2. Anthropometric measurements and body analysis	45
2.3. Biochemical determinations	48
2.4. Determination of hormones, myokine and hs-CRP	48
2.5. Metabolomic analysis	48
2.6. Statistical analysis	50
3. Study 1. Association of atherogenic indices with metabolically unhealthy obesity phenotype	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis	52
3.3. Material and method	52

3.3.1. Participants	52
3.3.2. Study protocol	52
3.3.3. Statistical analysis	53
3.4. Results	53
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	58
4. Study 2. Influence of obesity on circulating irisin levels: results of a cross-sectional study	59
4.1. Introduction	59
4.2. Working hypothesis	60
4.3. Material and method	60
4.3.1. Participants	60
4.3.2. Study protocol	61
4.3.3. Statistical analysis	61
4.4. Results	62
4.5. Discussions	64
4.6. Conclusions	66
5. Study 3. Circulating amino acids as fingerprints of visceral adipose tissue independent of insulin resistance: a targeted metabolomic research	67
5.1. Introduction	67
5.2. Working hypothesis	68
5.3. Material and method	68
5.3.1. Participants	68
5.3.2. Study protocol	68
5.3.3. Measurement of serum amino acid levels	69
5.3.4. Statistical analysis	69
5.4. Results	70
5.4.1. Clinical and paraclinical data of participants	70
5.4.2. Identification of amino acids by the visceral adiposity area	71
5.4.3. Metabolic pathway analysis	77
5.4.4. Association of visceral adiposity area with identified amino acids - influence of insulin resistance	79
5.5. Discussions	79
5.6. Conclusions	82
6. Study 4. Metabolomic analysis of normal weight, healthy and unhealthy obesity: amino acid change across the spectrum of metabolic wellbeing	83
6.1. Introduction	83
6.2. Working hypothesis	83
6.3. Material and method	84

6.3.1. Participants	84
6.3.2. Study protocol	84
6.3.3. Measurement of serum amino acid levels	84
6.3.4. Statistical analysis	85
6.4. Results	85
6.5. Discussions	93
6.6. Conclusions	96
7. General conclusions	97
8. Originality and innovative contributions of the thesis	99
REFERENCES	101

Keywords: obesity, targeted metabolomics, insulin resistance, biomarkers, irisin.

INTRODUCTION

Obesity is a chronic, epidemic, complex, recurrent and heterogeneous disease, being associated with multiple comorbidities and increased mortality. This places it as a major public health problem with special socio-economic implications. The complexity and heterogeneity of obesity as well as the chronic, recurrent evolution, require a multifactorial, multidisciplinary and long-term intervention. Obesity management must be individualized, and the objectives of the therapeutic intervention are: weight loss, maintaining it, preventing weight gain, controlling comorbidities and reducing the overall risk.

The pathogenesis of obesity is linked to three main mechanisms: the inflammatory and adipokinetic dysfunction of the adipose tissue, insulin resistance and the ectopic storage of the adipose tissue.

The clinical picture of obese people is dominated by comorbidities, the most common being metabolic (type 2 diabetes, dyslipidemia, hepatic steatosis or non-alcoholic status hepatitis), hypertension, cardiovascular, oncological, osteo-articular diseases and obstructive sleep apnea.

Metabolomics has led to the identification of a large number of metabolites that are associated with multiple pathologies, including obesity. In some cases they have the ability to predict the development of a disease or the results of specific interventions. Precise phenotyping with the help of metabolomics represents a potential for its application in medical practice by clinicians, for a precise medicine and individualized recommendations. The heterogeneity of obesity in terms of metabolomics is explained by the differences in amino acid levels (AA) in the distribution of adipose tissue, gender differences and obesity phenotypes associated with cardiovascular risk.

In conclusion, metabolomics offers additional possibilities for characterizing the phenotypes of obesity, and thus opens the way to individualized therapy.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The general part of the doctoral thesis consists of three chapters. The most important and novel data in the literature on obesity, its multisystem heterogeneity and the technique of metabolomics in obesity are briefly presented in these chapters.

The first chapter briefly describes the epidemiological, clinical, therapeutic and economic impact of obesity.

The second chapter, "Obesity, a heterogeneous multisystemic disease", briefly presents data on the pathogenesis and mechanisms involved in this complex pathology.

The third chapter, entitled "Obesity and metabolomics", summarizes the metabolomics techniques and types, as well as their importance in the heterogeneity of obesity.

PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the doctoral thesis consists of the working hypothesis, the general methodology, four research studies, general conclusions and the innovative contributions of the doctoral thesis.

Study 1. Association of atherogenic indices with metabolically unhealthy obesity phenotype

Introduction: It is well-known that obesity is an independent risk factor for the onset of type 2 diabetes and the cardiovascular disease. Studies have shown different types of metabolic obesity: the phenotype of metabolic healthy (MHO) and unhealthy (MUHO) obesity. People who fall into the first category are considered to have a lower risk of cardiometabolic complications, while the people who are metabolically unhealthy have a higher risk of mortality from any cause and cardiovascular events. Several indices / parameters are described in the literature for use in clinical practice and for estimation of the cardiovascular risk. They could help the clinician in predicting cardiovascular risk in obese people depending on the specific phenotype.

Working hypothesis: For a better phenotyping of obesity, different indices were studied to estimate the cardiovascular risk. The aim of this study was to compare atherogenic indices (the lipid accumulation product - LAP, atherogenic index, the non-HDL cholesterol / HDL cholesterol ratio, the LDL cholesterol / HDL cholesterol ratio and the hypertensive waist) from the obesity phenotypes, and to evaluate their association with the unhealthy metabolic phenotype.

Material and method: The study was a retrospective, observational one, in which data were collected from patients who presented for evaluation and nutritional recommendations in the private clinic "Regina Maria", Cluj-Napoca. A number of 163 obese people were included in the study. Their anthropometric and biochemical data and the data on body analysis performed by electrical bioimpedance were collected from the patients' medical records. The patients were divided into two groups

according to the criteria of metabolic syndrome (MS): MHO (BMI ≥ 30 kg / m² and the presence of MS), MUHO (BMI ≥ 30 kg / m² and the absence of MS criteria).

Results: Out of the whole group of people included in the study, 72.4% were included in metabolically unhealthy obesity phenotype. Depending on the phenotype of obesity, women are mostly characterized by the phenotype of MHO. In terms of body composition, there are significant statistical differences in the area of visceral fat and skeletal muscle mass, which are increased in people with MUHO. The medical history of the included people is dominated by the significantly increased presence of dyslipidemia and hypertensive waist in the people with MUHO. All studied atherogenic indices were significantly increased in the group of people with unhealthy metabolic obesity. In the analysis of unadjusted logistic regression, the results were statistically significantly associated ($p < 0.05$) with all indices that were investigated in MUHO. They also remained associated ($p < 0.05$) with MUHO after adjustments regarding sex, age, visceral fat area and HOMA-IR insulin resistance index.

Conclusions: In this study, we described several atherogenic indices, accessible in medical practice. They can help the clinician to identify the phenotype of people with unhealthy metabolic obesity, and to estimate the associated cardiovascular risk in order to apply specific preventive measures.

Study 2. Influence of obesity on circulating irisin levels: results of a cross-sectional study

Introduction: Irisin is a thermogenic adipomyokine produced primarily by the skeletal muscle and adipose tissue by cleavage of type III fibronectin. Irisin plays a key role in glucose homeostasis and is involved in the process of thermogenesis by stimulating the conversion of white adipose tissue to brown adipose tissue. The main metabolic effects attributed to irisin are the reduction in liver resistance to insulin, in serum glucose, the inhibition of glycogenesis and the stimulation of glycogenesis. However, studies report changes in irisin levels in obese people.

Working hypothesis: Evidence for the role of irisin, a newly discovered molecule in insulin resistance and inflammation, is limited and controversial, and the interaction mechanisms between them remain unknown.

Material and method: This was a cross-sectional study conducted at the Centre for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, the County Emergency Clinical Hospital, Cluj-Napoca and "Regina Maria" Clinic in Cluj-Napoca. The study included 20 clinically healthy women, with normal weight, and 22 women who were obese (BMI ≥ 30 kg / m²), who presented for nutritional recommendations for a healthy lifestyle or for weight reduction. The enrollment period was between May 2017 and April 2021. Demographic data were recorded by history, clinical examination and biological sampling (serum glucose, lipid profile, creatinine, transaminases, insulinemia, hs-PCR highly sensitive C-reactive protein, irisin and adiponectin). Body composition analysis was performed by electrical bioimpedance.

Results: The obese group had significantly higher levels of irisin compared to the normal weight group. Also, hs-PCR and HOMA-IR were significantly higher in the obese participants than in those with normal BMI. No differences were observed

between age groups, total cholesterol, triglycerides, liver transaminases, creatine and adiponectin. Irisin was significantly correlated with BMI, the total adipose tissue, trunk and limb adipose tissue, hs-PCR and HOMA-IR. In the unadjusted univariate linear regression analysis, Lg irisin was associated with BMI, total adipose tissue, trunk and limb adipose tissue, hs-PCR, and HOMA-IR. No association with adiponectin was detected. After adjusting for total adipose tissue and age, irisin remained associated with hsCRP ($\beta = 0.378$, $p = 0.002$). No combination was observed after adiponectin and HOMA-IR adjustment.

Conclusions: Circulating irisin levels were found higher in obese women as compared to normal-weight women. The relationship between circulating irisin levels and insulin resistance was mediated by total adipose tissue. Higher irisin levels have been associated with systemic subclinical inflammation, assessed by hs-PCR, suggesting that they may be involved in obesity inflammation.

Study 3. Circulating amino acids - markers of visceral adiposity which are independent of insulin resistance: targeted metabolomics research

Introduction: New emerging technologies, such as targeted metabolomics, have helped identify biomarkers associated with obesity, but also some others that are predictive of metabolic disorders associated with this pathological condition. They also provided useful information on the molecular pathways involved in obesity. Because amino acids act as metabolic modulators, but also as a substrate for protein synthesis, they have been studied extensively in obesity.

Working hypothesis: Given that the amino acids identified in the visceral adiposity were associated with insulin resistance, in this study we looked into AA levels and their specific changes as an impression of increased visceral adiposity in a group of clinically healthy women.

Material and method: This is a cross-sectional study conducted between May 2017 and April 2021 in the Centre for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, the Emergency Clinical Hospital, Cluj-Napoca and the private clinic "Regina Maria", Cluj-Napoca. We included 42 healthy adult women with a normal weight (BMI 18.5-24.9 kg / m²) or obesity (BMI ≥ 30 kg / m²). Demographic data were recorded by taking a history, clinical examination and biological sampling, while the analysis of body composition was performed by electrical bioimpedance. The persons were divided into two groups according to the visceral fat area (VFA ≥ 100 cm² and VFA < 100 cm²), whereas the studied amino acids were identified by the targeted metabolomics technique.

Results: Comparison of the groups with VFA ≥ 100 cm² and < 100 cm² showed that 13 AA were significantly different in the studied groups. The VAF group ≥ 100 cm² showed higher levels of essential AA (valine, isoleucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, lysine, histidine), essential and non-essential conditional AA (proline, tyrosine, alanine, cysteine, serine) and significantly lower levels of glycine (non-essential AA) as compared to the women in the VFA group < 100 cm². The PLS-DA

analysis identified 5 metabolites of varying importance in VIP scores > 1 and, therefore, with significant variations between groups: tyrosine, proline, glycine, cysteine and isoleucine. For the pathway analysis, we mapped the metabolisation pathways correlated with the 5 metabolites. We identified 17 metabolic pathways when the groups were compared, with a p value corrected for FDR <0.05. Out of these, 5 metabolic pathways had impact scores ≥ 0.1 : metabolisation pathways of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis pathways; the tyrosine metabolism; the glycine, serine and threonine metabolism; the glyoxylate and dicarboxylate metabolism; the cysteine and methionine metabolism. We performed an adjusted linear regression for HOMA-IR, while all AAs included in this analysis were associated with VFA independent of HOMA-IR (p-value for all regression coefficients <0.05) and most combinations were positive, except glycine that was inversely associated with VFA.

Conclusions: In this study, we identified 5 amino acids that were associated with the area of visceral adiposity regardless of the insulin resistance index. They could be considered as future biomarkers of increased visceral adipose tissue.

Study 4. Metabolomic analysis of normal weight, healthy and unhealthy obesity: amino acid change across the spectrum of metabolic wellbeing

Introduction: Obesity is a complex and heterogeneous pathology, with several phenotypes described in the literature. Due to the heterogeneous and complex clinical manifestations of obesity, but also because of the fact that there is no clear definition of MHO, the prevalence of this subtype of obesity described in the literature varies. Thus, recent research on obesity has investigated biomarkers involved in this pathology, especially the AA levels by the technique of targeted metabolomics.

Working hypothesis: The aim of this study was to investigate changes in serum AA concentrations as markers of metabolic changes in people with metabolically healthy and unhealthy obesity compared to normal-weight people. Therefore, a targeted metabolomics approach analysing metabolic pathways is important not only for a more detailed understanding and deepening of obesity heterogeneity, but also of the clinical implications in MHO.

Material and method: This study was a cross-sectional study, conducted between May 2017 and April 2021 in the Centre for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Emergency Clinical Hospital, Cluj-Napoca and in the Private Clinic "Regina Maria", Cluj-Napoca. We enrolled 70 adult women divided into 3 groups. The control group, women with normal weight (BMI 18.5-24.9 kg / m²), the group with MHO represented by BMI ≥ 30 kg / m² without the metabolic syndrome, and the group with MUHO represented by BMI ≥ 30 kg / m² and the insulin-treated type 2 diabetes. Demographic data were recorded by taking a history, clinical examination, and biological sampling, while the amino acids were identified by the targeted metabolomics technique.

Results: Patients with MUHO had a higher BMI as compared to the MHO group and the normal weight group. Patients with MUHO were older, with higher blood sugar levels and increased triglycerides. There were no statistically significant differences regarding the cholesterol values. Twelve AAs with statistically significant different trends in the studied groups were identified. Using the PLS-DA model, 5 AA showed a significant variation between batches. Lysine is significantly increased in the groups with normal weight and MHO, as compared to those in the group with MUHO ($p < 0.05$). Cysteine levels increased along with the deterioration of the metabolic status, having the lowest level in the group with normal weight and the highest in the MUHO group ($p < 0.001$ for comparisons between groups). Asparagine and glutamine showed similar concentrations in the normal weight and MHO groups ($p > 0.05$) as compared to the MUHO group. Asparagine was significantly lower in these groups, while glutamine was significantly higher in these groups ($p < 0.05$ for these comparisons). Methionine values were higher in the ObMS group as compared to MUHO.

Conclusions: The values of the 5 identified amino acids could be used to assess the metabolic status in obese people, both when initially assessed and during the monitoring of the effects of therapeutic interventions.

Originality and innovative contributions of the thesis

This paper, which is an extensive analysis of the heterogeneity of obesity, is the first in our country to address this issue, and the studies in the personal research section are the first to assess obesity in terms of targeted metabolomics. In recent years, this technique is used to study the pathophysiological mechanisms involved not only in this pathology, but also in the phenotyping of obese people. The information obtained by metabolomics is and will be useful in the clinical practice of precise medicine. Precision medicine is a concept that involves preventive, diagnostic and personalized treatment measures in order to maximize treatment. To achieve these goals, research has focused on identifying biomarkers by using modern techniques such as targeted metabolomics. Recognition and characterization of metabolites, such as amino acids, provide additional information to characterize the phenotypes of obesity.

The innovative contribution of this thesis is to increase the visibility of these potential biomarkers, which could be used in clinical practice for a more accurate phenotyping of obese people and thus in making personalized treatment recommendations.

This thesis brings additional evidence of the clinical-anthropometric, metabolic and metabolomic heterogeneity with important implications in the approach of obese people: screening, evaluation, personalized therapeutic intervention and monitoring.