
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Markeri metabolomici în
hiperandrogenism**

Doctorand **Camelia Larisa Sulea (căs. Vonica)**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Carmen Emanuela Georgescu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Hiperandrogenismul	21
1.1. Date generale	21
1.2. Tumori secretante de androgeni	22
1.3. Hiperplazia congenitală de suprarenale non-clasică	22
1.4. Sindromul Cushing	23
2. Sindromul ovarelor polichistice	24
2.1. Date generale	24
2.2. Diagnosticul și fenotipurile clinice	24
2.3. Tulburările metabolice în sindromul ovarelor polichistice	28
2.3.1. Normoponderea și alterarea compoziției corporale	28
2.3.2. Obezitatea și supraponderea	30
2.3.3. Hiperandrogenismul	31
2.3.4. Insulinorezistența	33
2.3.5. Disfuncția adipocitară	34
2.3.6. Dislipidemia	36
2.4. Modificări neuroendocrine asociate sindromului de ovare polichistice	36
2.4.1. Leptina	36
2.4.2. Grelina	37
2.4.3. Adiponectina	37
2.4.4. Rezistina	38
2.4.5. Visfatina	38
2.5. Posibilități terapeutice în tulburările metabolice asociate sindromului de ovare polichistice	38
3. Metabolomica	41
3.1. Principii generale	41
3.1.1. Metabolomica țargetată	42
3.1.2. Metabolomica netargetată	42
3.2. Metabolomica în patologii endocrine	42
3.2.1. Cancerul tiroidian	42
3.2.2. Obezitatea	43
3.2.3. Diabetul zaharat tip 2	43
3.2.4. Endometrioza	46
3.3. Metabolomica în sindromul ovarelor polichistice	46
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	53

3. Studiul 1 - Biomarkeri lipidomici la femeile cu sindrom de ovare polichistice folosind cromatografia lichidă de înaltă performanță - timp de zbor cvadrupol electrospray într-un mod de ionizare pozitiv spectrometriei de masă	57
3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru	58
3.3. Material și metodă	58
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	65
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 - Metabolomica nețintită și țintită combinată, ca instrument în identificarea căilor metabolice semnificativ alterate în sindromul ovarelor polichistice	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru	72
4.3. Material și metodă	72
4.4. Rezultate	75
4.4.1. Substudiul 1. Profilul endocrinometabolic în PCO	75
4.4.2. Substudiul 2. Analiza metabolomică nețintită pe un lot extins de pacienți cu sindromul ovarelor polichistice	76
4.4.3. Substudiul 3. Identificarea unor biomarkeri metabolomici ai sindromului de ovare polichistice prin analiza metabolomică semi-țintită	86
4.4.4. Substudiul 4. Corelații între parametrii hormonali determinați prin imunoanaliză și seria moleculelor hormonale detectate la prelucrarea metabolomică	91
4.5. Discuții	95
4.6. Concluzii	99
5. Studiul 3 - Corelația biomarkerilor metabolomici cu parametrii hormonali, de inflamație și insulinorezistență	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru	102
5.3. Material și metodă	103
5.4. Rezultate	104
5.5. Discuții	109
5.6. Concluzii	111
6. Studiul 4 - Asocierea biomarkerilor metabolomici ai sindromului de ovare polichistice, identificați prin metabolomică semi-țintită cu markerii funcției endoteliale	112
6.1. Introducere	113
6.2. Ipoteza de lucru	114
6.3. Material și metodă	114
6.4. Rezultate	117
6.5. Discuții	124
6.6. Concluzii	125
7. Concluzii generale	127
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	129

CUVINTE-CHEIE: sindromul ovarelor polichistice, biomarkeri, metabolomică țargetată, metabolomică semitargetată, spectrometrie de masă, disfuncție endotelială, insulinorezistență.

INTRODUCERE

Sindromul de ovare polichistice (PCOS – *polycystic ovary syndrome*) se consideră a fi cea mai frecventă endocrinopatie în rândul femeilor aflate în perioada reproductivă. Totuși, etiopatogeneza acestei boli rămâne neclară și în zilele noastre, determinismul plurifactorial fiind conceptul cel mai des acceptat, astfel încât se consideră că PCOS este rezultatul interacțiunii factorilor de mediu cu bagajul genetic.

Patogeneza PCOS a fost legată deseori de instalarea rezistenței la insulină (IR), hipertonia hormonului luteinizant (LH) și o posibilă predispoziție intrinsecă la hiperandrogenism. Totodată, IR determină reducerea sintezei hepatice a globulinei transportoare a hormonilor sexuali (SHBG) și creșterea producției de androgeni, astfel determinând menstruații neregulate și manifestări fizice caracteristice.

PCOS este asociat cu diverse alterări metabolice, femeile cu PCOS dezvoltă de două ori mai des sindrom metabolic (SM) comparativ cu populația generală. Prezența PCOS este, totodată, asociată cu o prevalență mai crescută a diabetului zaharat de tip 2 (DZ2) dar și a bolii hepatice grase nonalcoolice (NAFLD), a apneei în somn, și dislipidemie mixte, independent de prezența sau absența obezității. Nu în ultimul rând, bolile cardiovasculare (BCV) și obezitatea sunt mai des întâlnite la pacientele cu PCOS.

Ținând cont de aceste comorbidități asociate cu PCOS, Societatea Europeană de Reproducere Umană și Embriologie (ESHRE – *European Society of Human Reproduction and Embryology*) și Colegiul American de Obstetricieni și Ginecologi (AOGC – *American College of Obstetrics and Gynecology*) recomandă screeningul periodic, atât prin măsuri clinice, cât și paraclinice, ale acestor patologii cronice metabolice. Astfel, se recomandă măsurarea tensiunii arteriale la fiecare vizită, dozarea profilului lipidic la diagnosticul PCOS, precum și efectuarea testului de toleranță la glucoză orală pentru screeningul DZ2. Screening-ul va continua periodic celor din grupa de risc cu o frecvență mai mare decât în populația generală. ESHRE recomandă suplimentar screeningul depresiei și a apneei obstructive de somn la pacienții supraponderali sau cu obezitate și PCOS.

Considerat un sindrom heterogen, prezentarea clinică a PCOS este variabilă. Cel mai adesea, pacientele cu PCOS se adresează personalului medical pentru semne de hiperandrogenism, tulburări de ciclul menstrual sau infertilitate. Constatarea unei morfologii ovariene de tip polichistic la ecografia pelvină poate fi evocatoare.

În prezent, nu este disponibil un test unic pentru diagnosticul PCOS. Totodată, majoritatea opțiunilor terapeutice țintesc simptomele PCOS. În cele din urmă, este imperios necesară identificarea unor noi strategii centrate pe diagnosticul precoce, monitorizarea și screeningul complicațiilor cronice și tratamentul specific, dar și de identificarea unor potențiali biomarkeri bazată pe utilizarea de noi metode neinvazive și specifice. În ultimii ani, una dintre abordările științifice în curs de dezvoltare este metabolomică.

Printre tehnicile „omice”, metabolomică poate elucida mecanisme patogenetice implicate în apariția PCOS. Utilizarea metabolomicii oferă informații valoroase despre compoziția formați în urma proceselor biochimice. Tulburările apărute la nivelul unui organism au impact asupra profilului calitativ și cantitativ al metaboliților. Astfel, datorită metabolomicii se pot detecta modificări biochimice de detaliu cu potențial impact în diagnosticul, caracterizarea fenotipică și tratamentul PCOS.

Funcția endotelială și rigiditatea vasculară sunt utilizați în cuantificarea aterosclerozei timpurii. Determinarea lor se poate face prin metode neinvazive cu ajutorul vasodilației mediate de flux (FMV) și

vitezei unde pulsului carotid-femural (PWV). Mai mult, acești parametri au fost raportați ca fiind predictori independenți ai evenimentelor CV în populația generală. Date din literatură raportează faptul că femeile cu PCOS au cu aproximativ 4% FMV mai mică față de populația de aceeași vârstă și IMC. Studii anterioare au arătat o asociere între PCOS și PWV, dar aceste rezultate ar putea fi influențate de vârstă, IMC și comorbidități precum hipertensiunea arterială.

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 hiperandrogenism, PCOS și metabolică.

În primul capitol, se tratează succint caracteristicile bioclinice ale hiperandrogenismului și principalele patologii răspunzătoare de hiperandrogenism.

Cel de-al doilea capitol, Sindromul ovarelor polichistice - se prezintă sintetic date despre diagnosticul PCOS, tulburările metabolice asociate acestui sindrom, modificările neuroendocrine, dar și posibilitățile terapeutice în tulburările metabolice din cadrul PCOS.

În cel de-al treilea capitol, denumit Metabolomica, sunt prezentate concis tipurile de metabolică și datele din literatură legate de metabolică în patologii endocrine.

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. Prin cele patru studii ne-am propus ca obiectiv principal identificarea biomarkerilor specifici PCOS prin metabolică neștită și validarea acestora cu ajutorul metabolicii țintite, dar și evaluarea asocierii acestor biomarkeri cu parametri de biochimie, clinici și markeri ai funcției endoteliale.

Studiul 1, denumit Biomarkeri lipidomici la femeile cu sindrom de ovare polichistice folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță - timp de zbor cvadropol electrospray într-un mod de ionizare pozitiv spectrometriei de masă, a avut ca obiective evaluarea profilului metabolic al pacientelor cu PCOS comparativ cu femeile eugonadice și identificarea celor mai importanți biomarkeri caracteristici sindromului de ovare polichistice. Acesta a fost un studiu cross-secțional în care au fost înrolate 15 femei cu PCOS și 15 femei sănătoase. Pacientele cu PCOS au avut IMC, raportului talie-șold (WHR) și scorul mediu Ferriman Gallwey (mFG) semnificativ mai mari, comparativ cu grupul de control. Totodată, rezultatele au relevat modificări particulare ale triacilglicerolilor (TG), metaboliților inflamatori (prostaglandine și leucotriene), fosfocoline, colestaniilor și metaboliților carnitinei. În cadrul acestui studiu, raportăm niveluri semnificativ crescute de TG și creșterea la limită a speciilor de diacilgliceroli (DG) la femeile cu PCOS în comparație cu femeile sănătoase. Această disfuncție metabolică poate fi parțial explicată printr-un IMC mai mare, dar mai ales prin adipozitatea viscerală prezente la femeile PCOS într-o măsură mai mare față de grupul de control. Rezultatele studiului au arătat valori crescute semnificativ a 2-hidroxi-lauroilcarnitinei și trans-2-dodecenoilcarnitinei în grupul PCOS comparativ cu femeile eugonadice, indicând prezența IR. Mai mult, compusul 20-oxo-leucotriene (LT) E4 a fost, de asemenea, găsit modificat în mod semnificativ în grupul PCOS în comparație cu controalele sănătoase. Acesta este un metabolit al oxidării lipidice a LT B4 exprimate în leucocitele umane. În plus, fosfocolina (PC), metabolit implicat la rândul ei la peroxidarea lipidelor s-a dovedit a fi de asemenea scăzută în grupul de PCOS studiat.

În studiul 2, numit Combinarea unei abordări metabolomice nețintite și semi-țintite pentru identificarea căilor metabolice semnificativ alterate în sindromul ovarelor polichistice, ne-am propus evaluarea profilului endocrino-metabolic în PCOS, identificarea profilului metabolomic nețintit al femeilor cu PCOS comparativ cu femeile eugonadice pe un lot extins de paciente, identificarea și validarea unor markeri metabolomici ai fenotipului clinic Rotterdam la paciente cu PCOS comparativ cu femei sănătoase, utilizând metabolomica semițintită și verificarea valorii profilului androgenilor în analiza metabolomică comparativ cu imunoanaliza. În acest studiu, am inclus 41 de femei cu PCOS și 31 de femei cauziene sănătoase potrivite ca vârstă cu grupul PCOS. Studiul 2 a fost subîmpărțit în 4 substudii. Primul substudiu s-a concentrat asupra profilului endocrinometabolic în PCOS. Al doilea substudiu a avut ca focus analiza metabolomică nețintită pe un lot extins de paciente cu PCOS și grup de control. În cel de-al treilea substudiu am folosit metabolomica semi-țintită pentru identificarea unor biomarkeri metabolomici ai PCOS, iar mai apoi, în cel de-al patrulea substudiu am corelat parametrii hormonal determinati prin imunoanaliză cu seria de molecule hormonale detectate la prelucrarea metabolomică. Rezultatele substudiului 1 evidențiază profilul endocrino-metabolic al pacientelor cu PCOS semnificativ alterat comparativ cu femeile aparent sănătoase. Datele antropometrice relevă o predispoziție viscerală a țesutului adipos, hiperandrogenismului clinic, cu un scor Ferriman-Gallwey semnificativ crescut, dar și prin hiperandrogenismul biochimic, obiectivat printr-un FAI, cFTe și androstendion semnificativ crescute. Riscul cardio-metabolic crescut în grupul PCOS se evidențiază printr-un indice HOMA-IR, PCR înalt senzitivă, endotelina-1 (ET-1) și TA semnificativ mai crescute comparativ cu grupul control. În substudiul 2 se observă că decanoilcarnitina este un biomarker metabolomic caracteristic pentru PCOS; acesta a fost identificat ca fiind crescut în grupul femeilor cu această disfuncție endocrină. Pe de altă parte, în plasma pacientelor cu PCOS, 3 lisofosfatidilcoline (LisoPC) diferite s-au dovedit a fi scăzute. Rezultatele actuale sunt consecvente cu studiul 1. De asemenea, acidul docosapentaenoic a fost crescut în grupul pacientelor cu PCOS. În substudiul 3, biomarkerii identificați prin metabolomică semi-țintită ca făcând parte din grupul carnitinelor au fost interpretați ca fiind semnificativ mai crescuți în grupul PCOS, 2 din cei 4 metaboliți evaluați. Acesta este primul studiu care identifică heptanoilcarnitina și L-Octanoilcarnitina ca fiind biomarkeri caracteristici PCOS în comparație cu femei eugonadice de aceeași vârstă. Mai mult, compusul sfingozin 1-fosfat (d16:1-P) a fost crescut în plasma pacientelor cu PCOS. În substudiul 4, de o importanță majoră pentru diagnosticul precoce și acurat al PCOS sunt rezultatele obținute cu ajutorul metabolomicii semi-țintite care evidențiază un set de biomarkeri hormonal care diferențiază femeile cu PCOS față de martorele sănătoase.

Studiul 3, denumit Corelația biomarkerilor metabolomici cu parametri hormonal, de inflamație și insulinorezistență, ne-am propus evaluarea corelației dintre IR, parametri de compoziție corporală și markerii metabolomici, identificarea corelațiilor dintre parametri de inflamație și biomarkerii metabolomici, stabilirea posibilelor corelații între parametri hormonal determinati prin imunoanaliză și metaboliții identificați prin metabolomică semi-țintită. În cadrul studiului au fost înrolate 55 de femei cu PCOS și 44 de femei eugonadice. Așadar, acest studiu raportează o asociere inversă semnificativă statistic între nivelul de IR și metabolitul LisoPC (18:1/0:0), date care corespund cu datele din literatură. IMC-ul, HOMA-IR și parametri de compoziție corporală legați de țesutul adipos sunt corelați pozitiv cu nivelul de cortizol și negativ cu un metabolit al cortizolului, și anume tetrahidrocortizon. Creșterea producției de hormoni steroizi a fost raportată anterior în PCOS și posibil implicată în mecanismele de patogeneză. În ceea ce privește parametri de inflamație, acidul docosapentenoic (C22:5) prezintă o relație de corelație inversă cu hsCRP. Acest acid este un acid gras Omega-3, și alături de acidul tetracosapentenoic (C24:5) și de acidul docosanoic (C22:0) corelează negativ cu parametri de IR, obezitate și inflamație. De asemenea, acesta este primul studiu care dovedește corelația dintre IMC și metabolitul acidul tetranor 12-hidroxicosetetraenoic (HETE). Un derivat oxidat al colesterolului, 7 α ,27-dihidroxicolesterol a fost de asemenea asociat cu IMC-ul la pacienții incluși în studiu. Aceste date sunt parțial explicate de fenotipul caracteristic de MetS al pacientelor cu PCOS și de profilul lipidic alterat al acestor femei. De asemenea, metaboliții corelați cu nivelul de hormoni sexuali determinati prin imunoanaliză fac parte din clasa carnitinelor și a LisoPC. L-octanoilcarnitina este corelată pozitiv cu nivelul de testosteron din cauza rolului său antioxidant. Decanoilcarnitina a fost invers asociată cu nivelul de testosteron liber calculat. Acest tip de

carnitină face parte din clasa L-carnitinelor. De asemenea, lisoPC (16:0/0:0) s-a corelat pozitiv cu nivelul de SHBG și negativ cu FAI și cFTe. Această relație duală a acestui metabolit este explicată de caracteristicile diferite a celor trei parametri serici, cunoscut fiind faptul că SHBG este scăzut în PCOS, iar FAI și cFTe prezintă valori crescute în cadrul aceluiași sindrom. În concluzie, din cei 25 de metaboliți identificați prin metabolomică semițintită, carnitinele, LisoPC și acizii grași omega-3 s-au corelat negativ cu parametri de IR, inflamație, IMC și adipozitate, iar metabolitul cortizol s-a corelat pozitiv cu aceiași parametri biochimici și paraclinici. De asemenea, lisoPC (16:0/0:0) s-a corelat pozitiv cu nivelul SHBG însă negativ cu FAI și cFTe, date explicate de implicarea IR în relația dintre parametri hormonal serici și LisoPC. Testosteronul însă a fost corelat pozitiv cu L-octanoilcarnitina.

Studiul 4, intitulat Asocierea biomarkerilor metabolomici ai PCOS, identificați prin metabolomică semițintită cu markerii funcției endoteliale ne-am propus identificarea și validarea biomarkerilor metabolomici ai injuriei vasculare în PCOS, apreciată pe baza parametrilor de pletismografie, am avut ca obiective identificarea biomarkerilor PCOS implicați în disfuncția endotelială (DE), prin metabolomică semițintită și validarea biomarkerilor statistic semnificativi caracteristici pentru PCOS și implicați în DE, ajustați pentru obezitate și IR. Acest studiu a avut un total de 50 de participante, dintre acestea 30 au fost femei cu PCOS, iar restul au fost femei eugonadice considerate grup control. Acest studiu a evaluat corelația statistică dintre parametri de metabolomică și datele de pletismografie la paciente cu PCOS comparativ cu grupul control. Rezultatele evidențiază faptul că Decanoilcarnitina, un metabolit al carnitinei care face parte din clasa acilcarnitinelor, s-a dovedit a prezenta o corelație inversă cu Tensiunea arterială diastolică măsurată cu ajutorul oscilometrului. În studiul de față, 3 Liso PC (diferite au fost invers asociate cu PWVAO. Datele din literatură sunt raportează rezultate în contradictoriu. Astfel, studiile recente, în contrast cu cele mai vechi, raportează valori mai scăzute ale Liso PC asociate cu rezultate nefavorabile ale bolii, raportate de către noi în studiul 2, dar și în studiul 3 care a cuprins o populație mult mai mare de paciente cu PCOS. Cu toate că, scopul acestui studiu a fost de a identifica amprenta metabolomică caracteristică pentru PCOS care este implicată în DE, la ajustarea realizată pentru vârstă, HOMA-IR și IMC, niciunul din cei 3 Liso PC nu a răspuns ca biomarker independent de aceste variabile. Așadar, în cadrul acestui studiu, biomarkerii identificați ca fiind corelați cu PWVAO sunt influențați de alți factori de risc CV cunoscuți. Totuși, aceste condiții, precum insulinorezistența și obezitatea, sunt caracteristice pentru PCOS, astfel contribuind în mod intricat în creșterea riscului CV. Pe de altă parte, 10,11-Dihidro-12R-hidroxi-leucotriene E4 a fost direct corelat cu frecvența cardiac (FC), însă acest biomarker nu și-a menținut asocierea după ajustarea cu factorii confondatori. Nu în ultimul rând, studiul actual a identificat sfingozin 1-fosfat (d16:1-P) ca fiind un biomarker metabolomic invers asociat cu FC. Acest biomarker nu și-a menținut asocierea după regresia liniară multiplă. Totuși, datele din literatură arată faptul că Sfingozin 1-fosfat este un puternic modulator al funcției endoteliale și al răspunsului endothelial la injurie. Decanoilcarnitina și 10,11-dihidro-12R-hidroxi-leucotriene E4 au fost biomarkerii asociați pozitiv cu TAD, respectiv cu FC. Biomarkerii metabolomici corelați negativ cu parametri de pletismografie sunt, Liso PC (16:0/0:0; 18:1/0:0; 18:2/0:0) și sfingozin 1-fosfat (d16:1-P). După ajustarea privind parametri confondatori precum vârsta, IMC și IR, doar decanoilcarnitina și-a menținut asocierea cu TAD.

Rezultatele celor 4 studii mari ne permit trasarea unor concluzii generale care confirmă prezența unui grup de biomarkeri metabolomici independent asociați cu PCOS și comorbiditățile sale cardiometabolice. Continuarea cercetării în aceste direcții, deschise de către această teză de doctorat, va viza elucidarea de mecanisme fiziopatologice care stau la baza acestei patologii și a comorbidităților asociate acesteia. Totodată, contribuie la diagnosticul precoce, stratificarea riscului cardiometabolic, prevenția complicațiilor și inițierea unui tratament individualizat.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de față contribuie la cunoașterea mecanismelor fiziopatologice implicate în dezvoltarea PCOS și a comorbidităților cardiometabolice asociate acestuia. Cu toate că designul studiilor tratează aspecte diferite ale bolii, acestea vin unul în completarea celuilalt.

Aspectele bolii care au fost vizate oferă informații de valoare cu privire la amprenta metabolomică din cadrul PCOS, impactul IR, obezității și a inflamației asupra acestei amprente și biomarkerii care semnalează disfuncția endotelială în PCOS. În ceea ce privește contribuțiile inovative ale tezei, amintim aportul adus în completarea amprente metabolomice caracteristice PCOS raportate insuficient și inconsecvent în literatura de specialitate. De asemenea, această teză de doctorat este prima din România care folosește tehnica metabolomică pentru evaluarea PCOS. Mai mult decât atât, cu scopul de a genera noi ipoteze s-a utilizat tehnica de metabolomică neșintită, mai apoi, datele identificate prin această metodă au fost ulterior validate prin metabolomică semișintită pe o populație mai mare de pacienți. Acest tip de abordare este mai puțin folosită în studii din cauza costurilor ridicate și a consumului crescut de produse biologice. Totodată, datele de metabolomică obținute au fost asociate cu datele de biochimie uzuale, cât și date de compoziție corporală determinate prin DXA.

De asemenea, acesta este primul studiu din literatura de specialitate care evaluează relația dintre biomarkerii metabolomici specifici pentru PCOS și parametri de pletismografie care caracterizează afectarea vasculară incipientă. Pe de-o parte, au fost aleși parametri ușor de accesat în practica clinică, precum sunt indicii de pletismografie. Pe de altă parte, acești parametri au fost asociați celor 25 de biomarkeri metabolomici identificați prin metabolomică semișintită.

Așadar, această teză de doctorat a prezentat atât tehnici inovative utilizate în diverse domenii ale medicinei precum metabolomica, cât și coroborarea acestora cu investigații clinice și paraclinice uzuale în practica clinică.

Astfel, teza de față, prin abordarea diverselor fațete ale PCOS, se dorește a fi un pas înainte către elucidarea mecanismelor complexe ce stau la baza acestei endocrinopatii heterogene. De asemenea, utilizarea amprente metabolomice poate stratifica pacienții în categorii de risc cardiometabolic diferit, astfel încât managementul să fie multifactorial, individualizat și cât mai precoce instituit.

DOCTORAL THESIS SUMMARY

**Metabolomic markers in
hyperandrogenism**

PhD candidate **Camelia Larisa Sulea (căs. Vonica)**

PhD coordinator **Prof. dr. Carmen Emanuela Georgescu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Hyperandrogenism	21
1.1. General data	21
1.2. Androgen-secreting tumors	22
1.3. Nonclassical congenital adrenal hyperplasia	22
1.4. Cushing syndrome	23
2. Polycystic ovary syndrome	24
2.1. General data	24
2.2. Diagnosis and clinical phenotypes	24
2.3. Metabolic disorders in polycystic ovary syndrome	28
2.3.1. Normal weight and altered body composition	28
2.3.2. Obesity and overweight	30
2.3.3. Hyperandrogenism	31
2.3.4. Insulin resistance	33
2.3.5. Adipocyte dysfunction	34
2.3.6. Dyslipidemia	36
2.4. Neuroendocrine changes associated with polycystic ovary syndrome	36
2.4.1. Leptin	36
2.4.2. Ghrelin	37
2.4.3. Adiponectin	37
2.4.4. Resistin	38
2.4.5. Visfatin	38
2.5. Therapeutic possibilities in metabolic disorders associated with polycystic ovary syndrome (cardiovascular diseases, dyslipidemia)	38
3. Metabolomics	41
3.1. General principles	41
3.1.1. Targeted metabolomics	42
3.1.2. Untargeted metabolomics	42
3.2. Metabolomics in endocrine pathologies	42
3.2.1. Thyroid cancer	42
3.2.2. Obesity	43
3.2.3. Type 2 diabetes	43
3.2.4. Endometriosis	46
3.3. Metabolomics in Polycystic Ovary Syndrome	46
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	49
2. General methodology	53
3. Study 1. Lipidomic biomarkers in women with polycystic ovary syndrome using high performance liquid chromatography -	57

quadrupol electrospray flight time in a positive ionization mode of mass spectrometry	
3.1. Introduction	57
3.2. Working hypothesis	58
3.3. Material and methods	58
3.4. Results	59
3.5. Discussions	65
3.6. Conclusions	69
4. Study 2. Combining a non-targeted and semi-targeted metabolomic approach to identify significantly altered metabolic pathways in polycystic ovary syndrome	71
4.1. Introduction	71
4.2. Working hypothesis	72
4.3. Material and methods	72
4.4. Results	75
4.4.1. Substudy 1. Endocrinometabolic profile in PCOS	75
4.4.2. Substudy 2. Untargeted metabolomics analysis on an extended group of patients with PCOS	76
4.4.3. Substudy 3. Identification of some metabolomic biomarkers of PCOS by semi-targeted metabolomic analysis	86
4.4.4. Substudy 4. Correlations between hormonal parameters determined by immunoassay and the series of hormonal molecules detected in metabolomics processing	91
4.5. Discussions	95
4.6. Conclusions	99
5. Study 3. Correlation of metabolomic biomarkers with hormonal parameters, inflammation and insulin resistance	101
5.1. Introduction	101
5.2. Working hypothesis	102
5.3. Material and methods	103
5.4. Results	104
5.5. Discussions	109
5.6. Conclusions	111
6. Study 4. Correlation of PCOS characteristic biomarkers determined by semi-targeted metabolomics with endothelial function markers	112
6.1. Introducere	113
6.2. Ipoteza de lucru	114
6.3. Material and methods	114
6.4. Results	117
6.5. Discussions	124
6.6. Conclusions	125
7. General conclusions	127

KEYWORDS: polycystic ovary syndrome, biomarkers, targeted metabolomics, semi-targeted metabolomics, mass spectrometry, endothelial dysfunction, insulin resistance.

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is considered to be the most common endocrinopathy among women during the reproductive period. However, the etiopathogenesis of this disease remains unclear up until today, with multifactorial determinism being the most commonly accepted concept, so that PCOS is considered to be the result of the interaction of environmental factors with genetic baggage.

The pathogenesis of PCOS has often been linked to the onset of insulin resistance (IR), luteinizing hormone (LH) hypertension and a possible intrinsic predisposition to hyperandrogenism. At the same time, IR causes a reduction in the hepatic synthesis of sex hormone transporting globulin (SHBG) and an increase in androgen production, thus causing irregular menstruation and characteristic physical manifestations.

PCOS is associated with various metabolic disorders, women with PCOS develop twice as often metabolic syndrome (MS) compared to the general population. The presence of PCOS is also associated with a higher prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2), but also of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), sleep apnea, and mixed dyslipidemia, regardless of the presence or absence of obesity. Last but not least, cardiovascular disease (CVD) and obesity is more common in patients with PCOS.

Given these comorbidities associated with PCOS, the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) and the American College of Obstetricians and Gynecologists (AOGC) recommend regular screening, both by clinical as well as paraclinical investigations of these chronic metabolic pathologies. Thus, it is recommended to measure blood pressure at each visit, the lipid profile at the diagnosis of PCOS, as well as to perform the oral glucose tolerance test for DZ2 screening. Screening will continue periodically to those in the risk group with a higher frequency than in the general population. ESHRE additionally recommends screening for depression and obstructive sleep apnea symptoms in overweight or obese patients and PCOS.

Considered a heterogeneous syndrome, the clinical presentation of PCOS is variable. Most often, patients with PCOS go to the medical staff for signs of hyperandrogenism, menstrual disorders or infertility. The finding of a polycystic ovary morphology on pelvic ultrasound can be evocative.

A single PCOS diagnostic test is currently not available. At the same time, most therapeutic options target PCOS symptoms. Finally, it is imperative to identify new strategies focused on early diagnosis, monitoring and screening for chronic complications and specific treatment, but also to identify potential biomarkers based on the use of new non-invasive and specific methods. In recent years, one of the emerging scientific approaches is metabolomics.

Among the "omic" techniques, metabolomics can elucidate pathogenetic mechanisms involved in the occurrence of PCOS. The use of metabolomics provides valuable information about compounds formed as a result of biochemical processes. Disorders in an organism have an impact on the qualitative and quantitative profile of metabolites. Thus, due to metabolomics, detailed biochemical changes with potential impact in the diagnosis, phenotypic characterization and treatment of PCOS can be detected.

Endothelial function and vascular stiffness are used in the quantification of early atherosclerosis. Their determination can be done by non-invasive methods using flow-mediated vasodilation (FMV) and carotid-

femoral pulse wave velocity (PWV). Moreover, these parameters have been reported as independent predictors of CV events in the general population. Data from the literature report that women with PCOS have approximately 4% less FMV than the same age population and BMI. Previous studies have shown an association between PCOS and PWV, but these results could be influenced by age, BMI and comorbidities such as high blood pressure.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The general part of the doctoral thesis consists of three chapters. In these chapters are briefly presented the most important and novel data from the literature on hyperandrogenism, PCOS and metabolomics.

In the first chapter, the bioclinical characteristics of hyperandrogenism and the main pathologies responsible for it are briefly presented.

The second chapter - Polycystic ovary syndrome - presents synthetic data on the diagnosis of PCOS, the metabolomic disorders associated with this syndrome, neuroendocrine changes, but also the therapeutic possibilities for the metabolic disorders in PCOS.

In the third chapter, called Metabolomics, concisely presents the types of metabolomics and the literature data related to metabolomics in endocrine pathologies.

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. Through the four studies, we aimed to identify PCOS-specific biomarkers by non-targeted metabolomics and validate them using targeted metabolomics, but also to evaluate the association of these biomarkers with biochemical parameters, clinics and markers of endothelial function.

The first study, called Lipidomic biomarkers in women with polycystic ovary syndrome using high-performance liquid chromatography - quadrupole electrospray flight time in a positive ionization mode of mass spectrometry, aimed to evaluate the metabolomic profile of women with PCOS compared to healthy women and the identification of the most important biomarkers characteristic of polycystic ovary syndrome. This was a cross-sectional study in which 15 women with PCOS and 15 healthy women were enrolled. Patients with PCOS had significantly higher BMI, waist-to-hip ratio (WHR) and mean Ferriman Gallwey score (mFG) compared to the control group. At the same time, the results revealed particular changes in triacylglycerols (TG), inflammatory metabolites (prostaglandins and leukotrienes), phosphocholines, cholestanes and carnitine metabolites. In this study, we report significantly elevated TG levels and borderline increase in diacylglycerol (DG) species in women with PCOS compared to healthy women. This metabolic dysfunction can be partially explained by a higher BMI, but especially by the visceral adiposity present in PCOS women to a greater extent than the control group. Also, we found significantly increased values of 2-hydroxy-l-carnitine and trans-2-dodecenoyl-carnitine in the PCOS group compared to eugonadic women, indicating the presence of IR. Furthermore, the 20-oxo-leukotrienes (LT) E4 compound was also found to be significantly altered in the PCOS group compared to healthy controls. It is a metabolite of lipid oxidation of LT B4 expressed in human leukocytes. In addition, phosphocholines (PC), a metabolite involved in lipid peroxidation in turn, was also found to be low in the PCOS group studied.

In the second study, called Combining a non-targeted and semi-targeted metabolomic approach to identify significantly altered metabolic pathways in polycystic ovary syndrome, we aimed to evaluate the endocrinometabolic profile of PCOS, identification of PCOS metabolomic profile via non-targeted metabolomic

in an extended group of patients, identification and validation of metabolomic markers of the Rotterdam clinical phenotype in patients with PCOS compared to healthy women, using semi-targeted metabolomics and verification of the value of androgen profile in metabolomic analysis compared to immunoassay. In this study, we included 41 women with PCOS and 31 healthy Caucasian women age- and BMI-matched with the PCOS group. This study was subdivided into 4 substudies. The first substudy focused on the endocrinometabolic profile in PCOS and control group. The second substudy focused on non-targeted metabolomics analysis on a large group of patients with PCOS. In the third substudy we used semi-targeted metabolomics to identify metabolomic biomarkers of PCOS, and later, in the fourth substudy we correlated the hormonal parameters determined by immunoassay with the series of hormonal molecules detected in metabolomics processing. The results of the first substudy highlights the significantly altered endocrinometabolic profile of patients with PCOS compared to healthy women. Anthropometric data reveal a visceral predisposition of adipose tissue, clinical hyperandrogenism, with a significantly increased Ferriman-Gallwey score, but also by biochemical hyperandrogenism, via a significantly increased FAI, cFTe and androstenedione. The increased cardio-metabolic risk in the PCOS group is shown by a higher HOMA-IR index, highly sensitive PCR and endothelin-1 (ET-1), but also a significantly higher BP compared to the control group. Substudy 2 shows that decanoylcarnitine is a characteristic metabolomic biomarker for PCOS; it has been identified as increased in the group of women with this endocrine dysfunction. Also, in the plasma of patients with PCOS, 3 different lysophosphatidylcholines (LisoPC) proved to be decreased. The current results are consistent with the first study. Docosapentaenoic acid was also increased in the group of patients with PCOS. In the third substudy, biomarkers identified by semi-targeted metabolomics as part of the carnitine group were interpreted as significantly higher in the PCOS group. This is the first study to identify heptanoylcarnitine and L-Octanoylcarnitine as characteristic PCOS biomarkers compared to eugonadic women of the same age. Furthermore, the sphingosine 1-phosphate compound (d16: 1-P) was increased in the plasma of patients with PCOS. In the fourth substudy, the results obtained with the help of semi-targeted metabolomics highlighting a set of hormonal biomarkers that differentiate women with PCOS from healthy controls are of major importance for the early and accurate diagnosis of PCOS.

In the third study, called Correlation of metabolomic biomarkers with hormonal parameters, inflammation and insulin resistance, we aimed to evaluate the correlation between IR, body composition parameters and metabolomic markers, to identify the correlations between inflammation parameters and metabolomic biomarkers, to establish possible correlations between hormonal parameters by immunoassay and metabolites identified by semi-targeted metabolomics. The study enrolled 55 women with PCOS and 44 eugonadic women. Therefore, this study reports a statistically significant inverse association between the level of IR and the metabolite LisoPC (18: 1/0: 0), data that correspond to the data in the literature. BMI, HOMA-IR, and body composition parameters related to adipose tissue are positively correlated with cortisol levels and negatively correlated with a cortisol metabolite, namely tetrahydrocortisone. Increased steroid hormone production has been previously reported in PCOS and possibly involved in the mechanisms of pathogenesis. Regarding inflammation parameters, docosapentenoic acid (C22: 5) has an inverse correlation relationship with hsCRP. This acid is an Omega-3 fatty acid, and together with tetracosapentenoic acid (C24: 5) and docosanoic acid (C22: 0) it correlates negatively with parameters of IR, obesity and inflammation. This is also the first study to demonstrate the correlation between BMI and the metabolite tetranor 12-hydroxyheicosatetraenoic acid (HETE). An oxidized cholesterol derivative, 7a, 27-dihydroxycholesterol was also associated with BMI for the patients included in the study. These data are partly explained by the characteristic MetS phenotype of patients with PCOS and the altered lipid profile of these women. Also, metabolites correlated with the level of sex hormones determined by immunoassay are part of the class of carnitines and LisoPC. L-octanoylcarnitine is positively correlated with testosterone levels due to its antioxidant role. Decanoylcarnitine was inversely associated with the calculated free testosterone level. This type of carnitine belongs to the class of L-carnitines. Also, lisoPC (16: 0/0: 0) correlated positively with SHBG levels and negatively with FAI and cFTe. This dual relationship of this metabolite is explained by the different characteristics of the three serum parameters, it is

known that SHBG is low in PCOS, and FAI and cFte have increased values in the same syndrome. In conclusion, of the 25 metabolites identified by semi-targeted metabolomics, carnitines, LisoPC and omega-3 fatty acids were negatively correlated with parameters of IR, inflammation, BMI and adiposity, and the metabolite cortisol was positively correlated with the same biochemical and paraclinical parameters. . Also, lisoPC (16: 0/0: 0) correlated positively with SHBG level but negatively with FAI and cFte, data explained by the involvement of IR in the relationship between serum hormonal parameters and LisoPC. Nonetheless, testosterone has been positively correlated with L-octanoylcarnitine.

The forth study, entitled Association of metabolomic biomarkers of PCOS, identified by semi-targeted metabolomics with markers of endothelial function, we aimed to identify and validate metabolomic biomarkers of vascular injury in PCOS, assessed based on plethysmography parameters and to identify PCOS in endothelial function (ED), by semi-targeted metabolomics and validation of statistically significant biomarkers characteristic of PCOS and involved in ED, adjusted for obesity and IR. This study had a total of 50 participants, of which 30 were women with PCOS, and the rest were eugonadic women considered the control group. This study evaluated the statistical correlation between metabolomics parameters and plethysmography data in patients with PCOS compared to the control group. The results show that decanoylcarnitine, from the acylcarnitine class, has been shown to have an inverse correlation with diastolic blood pressure measured with an oscillometer. In the present study, 3 different Liso PCs were inversely associated with PWVAO. Data from the literature are reporting conflicting results. Thus, recent studies, in contrast to older ones, report lower Liso PC values associated with unfavorable disease outcomes, reported by us in the second study but also in the third which included a much larger population of patients with PCOS. Although the aim of this study was to identify the characteristic metabolomic fingerprint for PCOS that is involved in ED, adjusted for age, HOMA-IR and BMI, none of the 3 Liso PCs responded as a biomarker independent of these variables. Therefore, in this study, biomarkers identified as correlated with PWVAO are influenced by other known CV risk factors. However, these conditions, such as IR and obesity, are characteristic of PCOS, thus intricately contributing to increased CV risk. On the other hand, 10,11-dihydro-12R-hydroxy-leukotrienes E4 was directly correlated with heart rate (HR), but this biomarker did not maintain its association after adjustment with confounding factors. Last but not least, the current study identified sphingosine 1-phosphate (d16: 1-P) as an inverse metabolomic biomarker associated with HR. This biomarker did not maintain its association after multiple linear regression. However, data from the literature show that sphingosine 1-phosphate is a potent modulator of endothelial function and endothelial response to injury. Decanoylcarnitine and 10,11-Dihydro-12R-hydroxy-leukotrienes E4 were biomarkers positively associated with TAD and FC, respectively. The metabolomic biomarkers negatively correlated with plethysmography parameters are, Liso PC (16: 0/0: 0; 18: 1/0: 0; 18: 2/0: 0) and sphingosine 1-phosphate (d16: 1-P). After adjusting for confounding parameters such as age, BMI and IR, only decanoylcarnitine maintained its association with TAD.

The results of the 4 large studies allow us to draw some general conclusions that confirm the presence of a group of metabolomic biomarkers independently associated with PCOS and its cardiometabolic comorbidities. The follow-up research in these directions, opened by this PhD thesis, will aim to elucidate the pathophysiological mechanisms underlying this pathology and the comorbidities associated with it. At the same time, it contributes to the early diagnosis, the stratification of the cardiometabolic risk, the prevention of complications and the initiation of an individualized treatment.

Originality and innovative contributions of the thesis

The present thesis contributes to the knowledge of the pathophysiological mechanisms involved in the development of PCOS and of the cardiometabolic comorbidities associated with it. Although the design of the studies deals with different aspects of the disease, they complete each other.

The aspects of the disease that were targeted provide valuable information on the metabolomic fingerprint in PCOS, the impact of IR, obesity and inflammation on this fingerprint, and the biomarkers that signal endothelial dysfunction in PCOS. Regarding the innovative contributions of the thesis, we mention the contribution brought in addition to the characteristic metabolomic imprint PCOS reported insufficiently and inconsistently in the literature. Also, this PhD thesis is the first in Romania to use the metabolomics technique for the evaluation of PCOS. Moreover, in order to generate new hypotheses, the non-targeted metabolomics technique was used, then the data identified by this method were subsequently validated by semi-targeted metabolomics on a larger patient population. This type of approach is less used in studies due to high costs and increased consumption of samples. At the same time, the obtained metabolomics data were associated with the usual biochemistry data, as well as body composition data determined by DXA.

It is also the first study in the literature to evaluate the relationship between PCOS-specific metabolomic biomarkers and plethysmography parameters that characterize incipient vascular damage. On one hand, easily accessible parameters were chosen in clinical practice, such as plethysmography indices. On the other hand, these parameters were associated with the 25 metabolomic biomarkers identified by semi-targeted metabolomics.

Therefore, this PhD thesis presented both innovative techniques used in various fields of medicine such as metabolomics, and their corroboration with clinical and paraclinical investigations common in clinical practice.

Thus, the present thesis, by approaching the various faces of PCOS, is intended to be a step towards elucidating the complex mechanisms underlying this heterogeneous endocrinopathy. Also, the use of the metabolomics fingerprint can stratify patients into different cardiometabolic risk categories, so that management is multifactorial, individualized and established as early as possible.