
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Aspecte inflamatorii și metabolomice asociate acromegaliei

Doctorand **Oana Pînzariu (căs. Stănoiu-Pînzariu)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Acromegalia - cadru nosologic	21
1.1. Definiție	21
1.2. Etiologie	21
1.3. Clasificare	23
2. Manifestările clinice ale acromegaliei	24
3. Stabilirea diagnosticului în acromegalie	27
4. Managementul terapeutic al acromegaliei	28
5. Factorii prognostici în acromegalie	30
5.1. Aspecte clinice și biochimice	30
5.2. Aspecte histopatologice și imagistice	31
5.3. Aspecte moleculare	31
5.4. Aspecte ale răspunsului terapeutic	32
6. Aspecte inflamatorii asociate acromegaliei	33
6.1. Proteina solubilă α Klotho în acromegalie	33
6.1.1. Proteina solubilă α Klotho – date generale	33
6.1.2. Studiul proteinei solubile α Klotho în acromegalie	34
6.2. Proteina C reactivă înalt sensibilă în acromegalie	35
6.2.1. Proteina C reactivă înalt sensibilă – date generale	35
6.2.2. Studiul proteinei C reactive înalt sensibile în acromegalie	35
7. Aspecte metabolomice asociate acromegaliei	38
7.1. Metabolomica – tehnici, principii și aplicabilitate	38
7.2. Studiul metabolomic în acromegalie	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Studiul 1 – Profilul metabolomic al adenoamelor hipofizare	49
2.1. Introducere	49
2.2. Ipoteza de lucru	49
2.3. Material și metodă	49
2.3.1. Strategia de interogare și criteriile de eligibilitate	49
2.3.2. Evaluarea calității studiilor eligibile	50
2.4. Rezultate	50
2.4.1. Interogarea literaturii de specialitate	50
2.4.2. Analiza metabolomică versus analiza imunohistochimică în adenoamele hipofizare funcționale	51
2.4.3. Căile metabolice ale adenoamelor hipofizare secretante de ACTH	52
2.4.4. Studii metabolomice în adenoamele hipofizare secretante de gonadotropi și PRL	53
2.4.5. Metaboliții adenoamelor hipofizare versus alte tumori cerebrale	54
2.4.6. Metaboliții adenoamelor hipofizare identificați prin $^1\text{H-MRS}$ <i>in vivo</i>	55
2.4.7. Evaluarea calității studiilor incluse	58
2.5. Discuții	59
2.6. Concluzii	63

3. Studiul 2 – Metabolomica – o nouă perspectivă în înțelegerea patogenezei acromegaliei	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru	65
3.3. Material și metodă	65
3.3.1. Strategia de interogare și criteriile de eligibilitate	65
3.3.2. Evaluarea calității studiilor eligibile	66
3.4. Rezultate	66
3.4.1. Interogarea literaturii de specialitate	66
3.4.2. Profilul metabolomic în acromegalie	68
3.4.3. Metaboliții acromegaliei identificați prin ¹ H-MRS <i>in vivo</i>	69
3.4.4. Contribuția MALDI-MSI în acromegalie	69
3.4.5. Evaluarea metabolomică a depozitelor lipidice ectopice în acromegalie	70
3.4.6. Evaluarea metaboliților steroizi urinari în acromegalie	70
3.4.7. Evaluarea calității studiilor incluse	74
3.5. Discuții	75
3.6. Concluzii	78
4. Studiul 3 – Profilul lipidomic al acromegaliei active identificat prin cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru	79
4.3. Material și metodă	79
4.3.1. Populația de studiu	79
4.3.2. Măsurarea antropometrică	80
4.3.3. Analize de laborator	81
4.3.4. Analiza statistică	81
4.4. Rezultate	83
4.4.1. Populația de studiu	83
4.4.2. Profilul lipidomic în acromegalie	84
4.4.3. Relația dintre metaboliții lipidici, IGF-1, GH-ul random și perioada de expunere la GH	91
4.4.4. Profilul lipidomic al grupului acromegal naiv	92
4.4.5. Relația dintre metaboliții lipidici și parametrii metabolici în acromegalie	94
4.4.6. Profilul lipidomic al pacienților acromegali cu gușă nodulară	95
4.5. Discuții	96
4.6. Concluzii	97
5. Studiul 4 – Biomarkerii lipidomici ai comorbidităților cardiovasculare din acromegalie	99
5.1. Introducere	99
5.2. Ipoteza de lucru	99
5.3. Material și metodă	99
5.4. Rezultate	99
5.4.1. Profilul lipidomic al pacienților acromegali hipertensivi	99
5.4.2. Profilul lipidomic al pacienților acromegali cu cardiomiopatie	101
5.4.3. Profilul lipidomic al pacienților acromegali cu insuficiență cardiacă	102
5.5. Discuții	104
5.6. Concluzii	106

6. Studiul 5 – Rolul proteinei solubile α Klotho și al proteinei C reactive înalt sensibile în acromegalie	107
6.1. Introducere	107
6.2. Ipoteza de lucru	107
6.3. Material și metodă	107
6.3.1. Populația de studiu	107
6.3.2. Măsurarea antropometrică	108
6.3.3. Analize de laborator	108
6.3.4. Imagistica regiunii hipotalamo-hipofizare	109
6.3.5. Analiza statistică	109
6.4. Rezultate	109
6.5. Discuții	117
6.6. Concluzii	122
7. Concluzii generale	123
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	125
REFERINȚE	127

CUVINTE-CHEIE: acromegalie, adenom hipofizar secretant de hormon de creștere, lipidomică, metabolomică, spectrometrie de masă, proteina C reactivă înalt sensibilă, proteina solubilă α -Klotho

INTRODUCERE

Deși este o afecțiune rară, acromegalia prezintă adesea o evoluție nefavorabilă, mai ales prin complicațiile cardiovasculare și metabolice, dar și prin asocierea riscului neoplazic. În ciuda progreselor chirurgiei endoscopice transsfenoidale și a dezvoltării preparatelor medicamentoase cu rol în inhibarea hormonului de creștere (GH) sau de blocare a receptorului acestuia, heterogenitatea răspunsului terapeutic a rămas în continuare crescută. Această diversitate a răspunsului terapeutic întâlnită la pacienții acromegali a generat ideea de bază a cercetării cuprinsă în lucrarea de față.

Astfel, aceasta teza și-a propus, ca prin identificarea profilului metabolomic al acromegaliei și a principalelor căi metabolice alterate, să aducă noi informații despre patogeneza moleculară a bolii, putând fi adoptată, în viitor, o medicină personalizată la pacienții afectați. Mai mult decât atât, identificarea unor biomarkeri metabolomici ar putea contribui la îmbunătățirea managementului diagnostic al bolii.

Discrepanța dintre valorile GH-ului și ale factorului de creștere de tip insulenic 1 (IGF-1) ridică adesea probleme în stadializarea acromegaliei. Prin urmare, proteina solubilă α -klotho (α Kl), care pare a fi implicată în inhibarea căii de semnalizare a IGF-1, ar putea fi utilizată ca un nou biomarker de diagnostic sau de stadializare a bolii. Evidențierea rolului α Kl în acromegalie a reprezentat o altă temă de cercetare a acestei lucrări. În cele din urmă, luând în considerare frecvența crescută a complicațiilor metabolice și cardiovasculare ale acromegaliei, am considerat oportună investigarea posibilelor implicații aterogene ale proteinei C reactive înalt sensibile (hsCRP) la pacienții afectați.

Prima parte a tezei a inclus stadiul actual al cunoașterii referitor la metabolomica adenoamelor hipofizare (AH) secretante de GH, precum și date la zi despre α Kl și hsCRP în acromegalie.

Contribuția personală a tezei a fost cuprinsă în cinci capitole. Primul capitol a constatat în evaluarea sistematică a literaturii de specialitate, utilizând protocolul PRISMA, în scopul evaluării profilului metabolomic al AH și a contribuțiilor pe care spectroscopia de rezonanță magnetică (MRS) și tehnicile bazate pe spectrometria de masă (MS) le-au adus acestor patologii. În al doilea capitol focusul a fost centrat pe metabolomica AH secretante de GH, sub forma unei recenzii sistematice, în scopul înțelegerii mecanismelor moleculare ale acromegaliei. Al treilea

capitol a constatat într-un studiu experimental, de tip transversal, în care au fost înrolați 59 de pacienți cu acromegalie activă și 50 de subiecți sănătoși (SS), care a detectat profilul lipidomic al bolii active, utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu MS (HPLC-MS). Pe baza profilului lipidomic identificat inițial, analiza metabolomică netargetată a cuantificat biomarkerii lipidomici ai acromegaliei active. Al patrulea capitol a adus în prim plan biomarkerii lipidomici ai comorbidităților cardiovasculare din acromegalie, utilizând tehnica metabolomică mai sus menționată pe un grup de 59 pacienți acromegali. Ultimul capitol a evaluat concentrația serică a α KI și a hsCRP, utilizând metoda ELISA, în cadrul unui studiu transversal care a inclus 70 de pacienți acromegali și 30 SS.

Majoritatea pacienților acromegali și a SS au fost înrolați în cadrul Clinicii de Endocrinologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca. Însă, colaborarea cu o echipă de cercetare din cadrul Centrului Medical Universitar Radboud din Nijmegen, Olanda (Prof. Dr. Romana Netea-Maier), a contribuit la creșterea grupurilor de studiu. În colaborarea cu echipa mai sus menționată, am contribuit activ la efectuarea stimulării *ex-vivo* a sângelui integral pentru pacienții acromegali, în scopul evaluării unor citokine proinflamatorii. Rezultatele comune ale cercetării inflamației în acromegalie au fost publicate în Growth Hormone & IGF Research în aprilie 2021, în cadrul lucrării "The association between treatment and systemic inflammation in acromegaly" (doi: 10.1016/j.ghir.2021.101391).

Rezultatele obținute în lucrarea de față ar putea contribui la înțelegerea aprofundată a patogenezei acromegaliei, dezvoltarea de noi ținte terapeutice și abordarea, pe viitor, a medicinei personalizate în practica clinică. Mai mult decât atât, prin tematica abordată, cercetarea de față aduce o notă de originalitate, mai ales pe plan național. Pe plan internațional, rezultatele lucrării aduc un plus de valoare în domeniul metabolomicii acromegaliei, mai ales prin cuantificarea palmitoilor dihidrosfingomielinei și a fosforilcolinei în calitate de biomarkeri ai activității bolii. De asemenea, această teză descrie pentru prima dată în literatură potențialii metaboliți lipidici relaționați cu comorbiditățile cardiovasculare ale acromegaliei, aceștia fiind reprezentați de acidul linoleic, palmitoleil linolenatul, ceramida (Cer) (t18:0/20:0(2OH)) și lizofosfatidilinozitolul (LPI) (16:0).

Principala limitare a tezei a constat în talia mică a grupurilor de studiu, heterogenitatea probelor biologice studiate și a tehnicilor de analiză metabolomică utilizate (pentru recenziile sistematice) și design-ul transversal al celor trei studii experimentale.

Cele cinci studii ale lucrării au fost sprijinite financiar de Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, prin proiectul de cercetare doctorală nr. 1300/50/13.01.2017.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Profilul metabolomic al adenoamelor hipofizare

Introducere: Necesitatea stabilirii unui diagnostic precis și a unui management terapeutic individualizat, impune, tot mai mult, abordarea medicinei personalizate în toate domeniile medicale. Astfel, utilizarea tehnicii non-invazive $^1\text{H-MRS}$ *in vivo* pare să aducă informații personalizate din diverse tumori cerebrale, incluzând AH. Mai mult decât atât, dezvoltarea tehnicilor bazate pe MS, ce a avut loc în ultima decadă, va furniza, cu siguranță, panelul de metaboliți al fiecărei patologii cerebrale și va contribui, implicit, la identificarea de biomarkeri metabolomici de diagnostic sau prognostic.

Obiectiv: Scopul acestei cercetări a constat în identificarea profilului metabolomic al AH și a contribuției pe care tehnicile de analiză metabolomică au avut-o în detectarea acestuia.

Material și metodă: O recenzie sistematică a literaturii de specialitate a fost realizată prin intermediul bazelor de date PubMed, Web of Science Core Collection și Scopus, folosind următoarele cuvinte cheie: *metabolomics pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic biomarker pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic analysis pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic profile*

pituitary adenoma/tumor, metabolites pituitary adenoma, LC-MS pituitary adenoma/tumor, GC-MS pituitary adenoma/tumor, NMR spectrometry pituitary adenoma/tumor, MALDI pituitary adenoma/tumor, deoxycholic acid pituitary adenomas, 4-pyridoxic acid pituitary adenomas, phosphoethanolamine pituitary adenomas, alanine pituitary adenomas, N-acetyl aspartate pituitary adenomas, myo-inositol pituitary adenomas, 3-methyladipate pituitary adenomas, glutamate pituitary adenomas, glutamine pituitary adenomas, taurine pituitary adenomas. Au fost eligibile studiile efectuate pe subiecți umani, redactate în limba engleză, care au evaluat profilul metabolomic/biomarkerii metabolomici asociați AH sau contribuția MRS și a tehnicilor bazate pe MS în AH.

Rezultate: Optsprezece studii ce au înrolat 241 de pacienți cu AH au fost eligibile. MS și MRS, care sunt tehnici tradiționale utilizate în domeniul metabolomicii, sugerează o alterare importantă a metabolismului aminoacizilor în AH. N-acetil aspartatul, compușii colinici și creatina au fost metaboliții care au diferențiat extrem de acurat AH de țesutul hipofizar sănătos. Acizii deoxicolic și 4-piridoxic, 3-metiladipatul, acizii grași (AG) cu lanț scurt și glucozo-6-fosfatul pot fi considerați biomarkerii metabolomici ai AH secretante de ACTH. Titrul fosfoetanolaminei, al N-acetil aspartatului și al mio-inozitolului a fost scăzut în prolactinoame, iar cel al aspartatului, glutamatului și glutaminei a fost crescut. Fosfoetanolamina, taurina, alanina, compușii colinici, homocisteina și metionina au prezentat concentrații crescute la pacienții cu AH neclasificate (funcționale și nefuncționale). Utilizarea intraoperatorie a tehnicii de ionizare prin desorbție laser asistată de o matrice cu descompunerea sursei ionice (MALDI-MSI), care permite localizarea unui AH funcțional și delimitarea acestuia de țesutul hipofizar sănătos, poate contribui la creșterea succesului chirurgical, cu obținerea rezecției complete a AH, evitând pe cât posibil apariția/agravarea insuficienței hipofizare și a diabetului insipid postoperator.

Concluzie: Implementarea tehnicilor de analiză metabolomică de înaltă performanță în studiul AH va contribui, cu siguranță, la îmbunătățirea diagnosticului și, mai important, la managementul terapeutic, prin înțelegerea patogenezei moleculare a bolii și prin identificarea unor biomarkeri specifici. Până în prezent, tehnica MALDI-MSI s-a dovedit a fi un instrument extrem de util în tratamentul neurochirurgical al AH. Astfel, metabolomica pare a avea o perspectivă promițătoare în sfera AH și un punct de plecare în îngrijirea patologiei hipofizare.

Studiul 2. Metabolomica - o nouă perspectivă în înțelegerea patogenezei acromegaliei

Introducere: Heterogenitatea răspunsului terapeutic în acromegalie persistă, în ciuda progreselor medico-chirurgicale din ultimii ani. Astfel, implementarea medicinei personalizate, care se focusează mai degrabă pe pacient decât pe boală, este justificată. Metabolomica ar putea descifra mecanismele moleculare care stau la baza acestei heterogenități a răspunsului terapeutic. Identificarea principalelor alterări ale căilor metabolice ar deschide noi orizonturi în managementul terapeutic al acromegaliei.

Obiectiv: Cercetarea de față și-a propus să evalueze profilul metabolomic al acromegalie și contribuțiile metabolomicii în înțelegerea patogenezei bolii.

Material și metodă: O recenzie sistematică a literaturii de specialitate ce a evaluat pacienți acromegali prin tehnici metabolomice a fost efectuată prin interogarea a patru baze de date electronice. Următoarele combinații de cuvinte cheie au fost interogate: *acromegaly* sau *GH-secreting pituitary adenoma* și *metabolomics, metabolites, metabolomic biomarker, metabolomic fingerprint, metabolomic analysis, metabolomic profile, lipidomics, GC-MS, nuclear magnetic resonance spectrometry, proton magnetic resonance spectroscopy, LC-MS, ¹H-MRS, MALDI, choline, N-acetyl aspartate.*

Rezultate: Au fost eligibile douăzeci și unu de studii care au inclus 362 de pacienți cu acromegalie. Colina, metabolitul ubicuitar identificat în AH secretante de GH prin MRS *in vivo*, s-a corelat negativ cu expresia tumorală a receptorilor de somatostatina de tip 2 (SSTR2) și pozitiv cu hipersemnalul în secvența T2 de pe IRM-ul hipofizar și cu indicele de proliferare Ki-67. Mai mult, nivelul crescut al colinei și al raportului colină/creatină a diferențiat AH secretante

de GH slab granulate de cele dens granulate. MRS a detectat un conținut lipidic hepatic scăzut în acromegalia activă, care a crescut după obținerea controlului bolii. Panelul de metaboliți al acromegaliei identificat prin tehnicile bazate pe MS a inclus, cu precădere, aminoacizi (în special aminoacizii cu lanț ramificat și taurina), acid glicerolipidic și lipide. Principalele căi metabolice alterate în acromegalie au fost reprezentate de metabolismul glucozei (în special down-reglarea căii pentozo-fosfat), acidului linoleic, sfingolipidelor, glicerofosfolipidelor, argininei/prolinei și taurinei/hipotaurinei. MALDI-MSI a confirmat natura funcțională a AH secretante de GH și a discriminat cu precizie AH de țesutul hipofizar sănătos.

Concluzii: Deși MRS *in vivo* a cuantificat colina ca fiind metabolitul ubicuitar al AH secretante de GH și a evidențiat scăderea conținutului lipidic hepatic în acromegalia activă, tehnicile bazate pe MS par să aducă informații cruciale în înțelegerea patogenezei moleculare a bolii. În viitor, o înțelegere aprofundată a patogenezei acromegaliei prin intermediul metabolomicii va identifica noi ținte terapeutice, îmbunătățind astfel managementul bolii.

Studiul 3. Profilul lipidomic al acromegaliei active identificat prin cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă

Introducere: Lipidomica este o parte integrantă a metabolomicii ce se ocupă cu studiul lipidomului, acesta din urmă reprezentând totalitatea lipidelor dintr-un organism. Studiile lipidomice publicate până în prezent în acromegalie sunt limitate. Extinderea cercetării pe scară largă a lipidomului în acromegalie ar contribui la o mai bună înțelegere a patogenezei bolii.

Obiectiv: Scopul principal al cercetării a constat în identificarea profilului lipidomic al acromegaliei active, folosind HPLC-MS. De asemenea, studiul și-a propus să valideze potențialii biomarkeri lipidomici ai bolii.

Material și metodă: 59 pacienți cu acromegalie activă și 50 SS potriviți după vârstă, sex și indice de masă corporală (IMC) au fost înrolați într-un studiu transversal. Studiul s-a desfășurat în cadrul a două centre academice (Clinica Endocrinologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca, România și Centrul Medical Universitar Radboud, Nijmegen, Olanda) în perioada februarie 2017-iulie 2021. Analiza lipidomică netargetată s-a realizat cu ajutorul HPLC-MS.

Rezultate: Lotul acromegal a fost reprezentat de 23 de pacienți cu acromegalie naivă și 36 de pacienți necontrolați terapeutic. Grupul naiv a prezentat concentrații semnificativ mai mari ale IGF-1 și ale GH-ului random comparativ cu grupul necontrolat ($p < 0.0001$, respectiv $p = 0.0006$). Perioada de expunere la GH a fost mai mică în grupul naiv în comparație cu grupul necontrolat ($p < 0.0001$). În plus, glicemia bazală, indicele HOMA și LDL-colesterolul au prezentat valori mai mari la pacienții acromegali naivi față de pacienții necontrolați ($p < 0.05$). Hipotiroidismul central și gușa nodulară au fost mai frecvente în grupul necontrolat față de grupul naiv ($p < 0.05$). Semnătura lipidomică ce a diferențiat grupul acromegal de SS a inclus fosfolipide și hidrolizatele acestora, sfingomieline (SM), glicerolipide, ceramide, AG și esteri ai acestora, precum și steroizi și derivații lor. Fosforilcolina și palmitoil dihidrosfingomielinele au discriminat cel mai bine grupul acromegal de SS (VIP > 2.3, AUC > 0.93). Concentrația de palmitoil dihidrosfingomielină a fost semnificativ mai mare la pacienții acromegali naivi comparativ cu pacienții necontrolați ($p < 0.0001$). Un factor prognostic al titrului seric de palmitoil dihidrosfingomielină a fost reprezentat de lipsa intervenției terapeutice. Palmitoil dihidrosfingomielinele s-a corelat negativ cu perioada de expunere la GH ($r = -0.399$, $p = 0.001$) și pozitiv cu IGF-1 ($r = 0.270$, $p = 0.038$) și GH-ul random ($r = 0.434$, $p = 0.000$).

Concluzii: Palmitoil dihidrosfingomielinele și fosforilcolina pot fi considerați potențiali biomarkeri lipidomici ai acromegaliei. Palmitoil dihidrosfingomielinele pare a fi relaționată cu activitatea bolii.

Studiul 4. Biomarkerii lipidomici ai comorbidităților cardiovasculare din acromegalie

Introducere: Riscul de deces al pacienților acromegali este cu peste 60% mai mare față de populația generală, în principal, din cauza comorbidităților cardiovasculare. Astfel, identificarea unor biomarkeri de risc pentru complicațiile cardiovasculare ar putea schimba perspectiva terapeutică a acestor pacienți.

Obiectiv: Scopul principal al acestei cercetări a constat în identificarea biomarkerilor lipidomici ai comorbidităților cardiovasculare din acromegalie.

Material și metodă: descrisă la studiul 3.

Rezultate: Un procent de 52.54% din pacienții acromegali au prezentat HTA, cea mai mare pondere fiind atribuită pacienților naivi. Un procent de 15.25% din pacienții acromegali au asociat cardiomiopatie acromegală și 13.55% dintre aceștia au prezentat insuficiență cardiacă (IC). Doisprezece metaboliți au discriminat pacienții acromegali hipertensivi de cei cu valori tensionale normale ($p < 0.05$). Toți cei doisprezece metaboliți au fost introduși individual, ca variabile independente, într-o regresie liniară multiplă în trepte, pentru a identifica potențialii predictorii ai HTA în acromegalie. În cadrul acestei regresii au fost reținuți acidul linoleic, palmitoleil linolenatul, Cer (t18:0/20:0(2OH)) și raportul talie-șold ($R^2 = 0.50$, $F = 12.65$, $p < 0.0001$). La pacienții acromegali cu cardiomiopatie au fost identificate concentrații serice semnificativ crescute ale 12-HETE-GABA/N-nonadecanoil taurinei ($p = 0.037$) și concentrații scăzute ale LPA (20:1) ($p = 0.040$). Patruzeci și doi de metaboliți lipidici au discriminat pacienții acromegali cu IC de cei cu funcție cardiacă normală. Toți cei 42 de metaboliți au fost introduși individual ca variabile independente într-o regresie liniară multiplă în trepte pentru a identifica potențialii predictorii ai IC în acromegalie. În cadrul acestei regresii au fost reținuți LPI (16: 0) și perioada de expunere la GH ($R^2 = 0.40$, $F = 19.16$, $p < 0.0001$).

Concluzii: Acidul linoleic, palmitoleil linolenatul, Cer (t18:0/20:0 (2OH)) și LPI (16:0) pot fi considerați factori prognostici ai comorbidităților cardiovasculare din acromegalie.

Studiu 5. Rolul proteinei solubile α -klotho și al proteinei C reactive înalt sensibile în acromegalie

Introducere: Dozarea GH-ului și a IGF-1 este crucială în diagnosticarea și monitorizarea acromegaliei. Identificarea potențialelor discordanțe dintre acești doi parametri face dificilă stadializarea bolii și luarea celei mai bune decizii terapeutice. Astfel, identificarea unor noi biomarkeri diagnostici/prognostici ar simplifica managementul acromegaliei. Astfel, dozarea α Kl ar putea fi inclusă în schema de diagnostic a acromegalie sau în stadializarea bolii, având în vedere că marea majoritate a cercetărilor din domeniu au identificat concentrații înalte ale acestei proteine la pacienții cu acromegalie activă, manifestând o scădere considerabilă postoperatorie. În plus, detectarea rolului hsCRP în aterogeneză ridică noi direcții de cercetare în patologia cardiovasculară, inclusiv în cea asociată acromegaliei.

Obiective: Scopul principal al acestei cercetări a constat în investigarea titrului α Kl la pacienții acromegali, în funcție de răspunsul terapeutic și în detectarea potențialelor corelații ale α Kl cu metaboliții lipidici identificați în studiul 3, în grupul pacienților cu acromegalie activă. Scopul secundar al cercetării a fost acela de a evalua concentrația hsCRP la pacienții diagnosticați cu acromegalie.

Material și metode: 70 pacienți cu acromegalie și 30 SS potriviți după vârstă și IMC au fost înrolați într-un studiu transversal. Studiu s-a desfășurat în cadrul Clinicii Endocrinologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca, în perioada februarie 2017-iulie 2021. Grupul acromegal a fost divizat în trei subgrupuri, în funcție de răspunsul terapeutic, după cum urmează: grupul A (pacienți activi, $n = 50$) a inclus pacienți nou diagnosticați cu valori înalte ale IGF-1 și lipsa supresiei GH-ului post-TTGO ($GH > 1$ ng/ml), dar și pacienți aflați sub tratament, care prezentau valori crescute ale IGF-1 și o valoare de peste 1 ng/ml a GH-ului random; grupul B (pacienți controlați, $n = 15$) a inclus pacienți acromegali tratați care prezentau valori normale ale IGF-1 și o valoare a GH-ului random < 1 ng/ml; grupul C (pacienți vindecați) a inclus pacienți care nu mai urmau nici un fel de tratament și asociau valori normale ale IGF-1, respectiv o

supresie adecvată a GH-ului post-TTGO (GH <1 ng/ml) (n=5). Concentrația serică a α Kl și hsCRP a fost măsurată prin metoda sandwich ELISA.

Rezultate: Cele mai frecvente manifestări clinice ale grupului A au inclus dismorfismul acrofacial (94%), visceromegalia (60%), seboreea (58%), hiperhidroza (54%), manifestările osteoarticulare (52%) și cefaleea (50%). Cea mai frecventă comorbiditate cardiovasculară a grupului acromegal a fost HTA, urmată de cardiomiopatia acromegală și IC. Un procent de 46% din pacienții cu acromegalie activă au prezentat diabet zaharat (DZ) și prediabet. Un procent de 72.85% din grupul acromegal au prezentat macroadenoame hipofizare, 45.71% dintre acestea fiind invazive. Un procent de 75.71% din somatotropinoame au prezentat hipersemnal în secvența T2 pe IRM-ul hipofizar. Concentrația serică a IGF-1 și a GH-ului random a fost semnificativ mai mare în grupul A față de grupurile B și C ($p < 0.001$). Similar, indexul de IGF-1 a fost semnificativ mai mare în grupul A versus grupul B ($p < 0.0001$) și C ($p = 0.0004$). Nu s-au identificat diferențe semnificative statistice ale concentrației serice ale α Kl și hsCRP la pacienții acromegali și la grupul control ($p > 0.05$). Concentrația serică a α Kl și a hsCRP a fost relativ similară între cele trei subgrupuri de studiu ($p > 0.05$). S-a detectat o concentrație serică mai mică a α Kl la pacienții acromegali diabetici față de cei cu normoglicemie, însă fără valoare statistică ($p = 0.313$). Diferențe semnificative statistice ale α Kl serice nu au fost identificate între pacienții acromegali hipertensivi și cei normotensivi ($p = 0.556$). Nu s-au obținut corelații între α Kl și IGF-1, GH-ul random, vârsta sau sexul pacienților acromegali. Cele mai importante corelații între α Kl și metaboliții lipidici identificați în studiul 3 s-au obținut cu compusul necunoscut cu m/z de 443.3338 ($r = -0.5$, $p = 0.000$), LPA (22:5) ($r = -0.48$, $p = 0.000$) și linolenil stearat/linolenil oleat ($r = -0.45$, $p = 0.000$). Nu s-au obținut corelații între hsCRP și IGF-1 sau GH-ul random ($r < 0.25$, $p > 0.05$). Pacienții acromegali hipertensivi au prezentat concentrații mai mici ale hsCRP față de pacienții acromegali normotensivi, însă fără semnificație statistică ($p = 0.581$). Similar, pacienții acromegali care asociau DZ au prezentat titruri mai scăzute ale hsCRP față de pacienții acromegali normoglicemici, însă fără a exista diferențe semnificative statistice ($p = 0.086$). Pacienți acromegali care asociau hipercolesterolemie au avut titruri mai scăzute ale hsCRP comparativ cu pacienții acromegali ce prezentau un titru normal al colesterolului total, însă fără a fi detectată o diferență semnificativă statistic ($p = 0.430$).

Concluzii: Deși numeroase studii au sugerat o posibilă acțiunea inhibitorie a α Kl asupra căii de semnalizare a IGF-1, această proteină nu poate fi considerată un biomarker al acromegaliei, mai ales în situația coasocierii DZ. Alți potențiali factori, precum sedentarismul sau degradarea funcției renale, ar putea influența nivelul seric al α Kl. Astfel, ipoteza existenței mecanismelor independente de GH în secreția α Kl devine din ce în ce mai evidentă. De asemenea, hsCRP nu pare a fi relaționată cu patologia cardiovasculară și metabolică din acromegalie, prin efectul său aterosgen.

Concluzii generale

1. Principala cale metabolică alterată în AH, utilizând tehnicile de analiză metabolomică, a fost reprezentată de metabolismul aminoacizilor.
2. Compușii colinici, N-acetil aspartatul și creatina au discriminat cel mai bine AH de țesutul hipofizar sănătos, utilizând MRS și tehnicile bazate pe MS.
3. Acizii deoxicolic și 4 piridoxic, 3-metil adipatul, glucozo-6-fosfatul și AG cu lanț scurt au fost biomarkerii metabolomici identificați în AH secretante de ACTH.
4. Prolactinoamele au prezentat titruri înalte ale glutaminei și glutamatului, precum și titruri scăzute ale fosfoetanolaminei, N-acetil aspartatului și mio-inozitolului.
5. AH nefuncționale au prezentat titruri înalte ale fosfoetanolaminei, alaninei, taurinei, homocisteinei, metioninei și compușilor colinici.
6. MALDI-MSI, utilizată intraoperator, a detectat cu acuratețe granița dintre AH și țesutul hipofizar indemn. Astfel, utilizarea acestei tehnici pe scară largă va îmbunătăți, în viitor, rezultatele tratamentului chirurgical. În plus, MALDI-MSI a confirmat caracterul funcțional al AH, inclusiv în cele secretante de GH, prin identificarea hormonilor hipofizari și a componentelor ionice ale acestora.

7. Colina este metabolitul ubicuitar identificat în AH secretante de GH, detectat prin tehnica MRS *in vivo*, corelându-se negativ cu expresia tumorală a SSTR2 și pozitiv cu indicele Ki67 și semnalul MRI în secvența T2. În plus, colina și raportul colină/creatină au diferențiat AH secretante de GH slab granulate de cele dens granulate.
8. MRS a detectat un conținut lipidic hepatic scăzut la pacienții cu acromegalie activă, care a crescut după obținerea controlului bolii.
9. Panelul de metaboliți al acromegaliei, identificat prin tehnicile bazate pe MS au inclus aminoacizi (în special cei cu lanț ramificat și taurina), acid glicerolipidic și lipide.
10. Principalele căi metabolice alterate ale acromegaliei au inclus metabolismul glucozei (cu precădere calea pentozo-fosfat), metabolismul acidului linoleic, al svingolipidelor, glicerolipidelor, argininei/prolinei și taurinei/hipotaurinei.
11. Profilul lipidomic al acromegaliei active, identificat în cercetarea noastră, prin tehnica HPLC-MS, au inclus SM, fosfolipide și hidrolizatele acestora, ceramide, AG și esterii acestora, glicerofosfolipide, carnitine, steroizi și derivații acestora.
12. Fosforilcolina și palmitoil dihidrosfingomielina au discriminat cel mai bine pacienții cu acromegalie activă de SS, putând fi considerați biomarkeri ai activității bolii. În plus, palmitoil dihidrosfingomielina s-a corelat pozitiv cu IGF-1 și GH-ul random și negativ cu perioada de expunere la GH.
13. Acidul linoleic, palmitoileil linolenatul, Cer (t18:0/20:0(2OH)) și lizofosfatidilinozitolul (16:0) au fost factori predictivi ai complicațiilor cardiovasculare din acromegalia activă.
14. α Kl nu a putut fi considerat un biomarker al acromegaliei, mai ales în situația coasocierii DZ.
15. HsCRP nu pare a contribui la afectarea cardiovasculară și metabolică din acromegalie, prin efectul său aterogen.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Însăși tematica abordată face ca această lucrare să fie una originală și de actualitate. Astfel, utilizarea unei tehnici metabolomice de vârf, precum HPLC-MS, a identificat cu acuratețe panelul lipidomic al acromegaliei active, cuantificând ulterior biomarkerii lipidomici ai activității bolii și cei ai complicațiilor cardiovasculare. Această descoperire științifică este o premieră la nivel național și internațional. Contribuția generală a cercetării lipidomice în acromegalie ar putea contribui, în viitor, la dezvoltarea de noi ținte terapeutice, precum și la implementarea terapilor personalizate în practica clinică.

În plus, studiul judicious al literaturii de specialitate a detectat amprenta metabolomică/lipidomică a AH (incluzându-le și pe cele secretante de GH), precum și principalele căi metabolice alterate ale acestora. Aceste date vor contribui, cu siguranță, la înțelegerea patogenezei moleculare a acestor patologii.

Studiul α Kl, o proteină relativ recent descoperită, a reprezentat un alt element de originalitate al acestei teze. Identificarea rolului α Kl și a hsCRP în acromegalie, ar putea contribui la aprofundarea patogenezei cardiovasculare și metabolice a bolii.

SUMMARY OF THESIS

Inflammatory and Metabolomic Aspects Associated with Acromegaly

PhD student **Oana Pînzariu (căs. Stănoiu-Pînzariu)**

PhD supervisor **Prof. dr. Carmen Georgescu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Acromegaly - nosological framework	21
1.1. Definition	21
1.2. Etiology	21
1.3. Classification	23
2. Clinical manifestations of acromegaly	24
3. Establishing the diagnosis in acromegaly	27
4. Therapeutic management of acromegaly	28
5. Prognostic factors in acromegaly	30
5.1. Clinical and biochemical aspects	30
5.2. Histopathological and imaging aspects	31
5.3. Molecular aspects	31
5.4. Aspects of therapeutic response	32
6. Inflammatory aspects associated with acromegaly	33
6.1. Soluble α -Klotho protein in acromegaly	33
6.1.1. Soluble α -Klotho protein - general data	33
6.1.2. Study of soluble α -Klotho protein in acromegaly	34
6.2. High-sensitivity C-reactive protein in acromegaly	35
6.2.1. High-sensitivity C-reactive protein – general data	35
6.2.2. Study of high-sensitivity C-reactive protein in acromegaly	35
7. Metabolomic aspects associated with acromegaly	38
7.1. Metabolomics - techniques, principles, and applicability	38
7.2. Study of metabolomics in acromegaly	40
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	47
2. Study 1 – The metabolomic profile of pituitary adenomas	49
2.1. Introduction	49
2.2. Working hypothesis/objectives	49
2.3. Material and methods	49
2.3.1. Search strategy and eligibility criteria	49
2.3.2. Evaluation of the quality of eligible studies	50
2.4. Results	50
2.4.1. Literature search	50
2.4.2. Metabolomic analysis versus immunohistochemical analysis in functional pituitary adenoma	51
2.4.3. The metabolic pathways of ACTH-secreting pituitary adenomas	52
2.4.4. Metabolomic studies in gonadotropin and prolactin-secreting pituitary adenomas	53
2.4.5. Metabolites of pituitary adenomas versus other brain tumors	54
2.4.6. Metabolites of pituitary adenomas identified through <i>in vivo</i> ^1H -MRS	55
2.4.7. Assessment of the quality of included studies	58
2.5. Discussion	59

2.6. Conclusions	63
3. Study 2 – Metabolomics - a new perspective in understanding the pathogenesis of acromegaly	65
3.1. Introduction	65
3.2. Working hypothesis/objectives	65
3.3. Material and methods	65
3.3.1. Search strategy and eligibility criteria	65
3.3.2. Evaluation of the quality of eligible studies	66
3.4. Results	66
3.4.1. Literature search	66
3.4.2. Metabolomic profile in acromegaly	68
3.4.3. Metabolites of acromegaly identified through <i>in vivo</i> ¹ H-MRS	69
3.4.4. The contribution of MALDI-MSI in acromegaly	69
3.4.5. Metabolomic evaluation of ectopic lipid deposits in acromegaly	70
3.4.6. Evaluation of urinary steroid metabolites in acromegaly	70
3.4.7. Assessment of the quality of included studies	74
3.5. Discussion	75
3.6. Conclusions	78
4. Study 3 – The lipidomic profile of active acromegaly identified by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry	79
4.1. Introduction	79
4.2. Working hypothesis/objectives	79
4.3. Material and methods	79
4.3.1. Study population	79
4.3.2. Anthropometric measurement	80
4.3.3. Laboratory analysis	81
4.3.4. Statistical analysis	81
4.4. Results	83
4.4.1. Study population	83
4.4.2. Lipidomic profile in acromegaly	84
4.4.3. The relationship between lipid metabolites, IGF-1, random GH, and GH exposure duration	91
4.4.4. Lipidomic profile of the naive acromegaly group	92
4.4.5. The relationship between lipid metabolites and metabolic parameters in acromegaly	94
4.4.6. Lipidomic profile of acromegaly patients with nodular goiter	95
4.5. Discussion	96
4.6. Conclusions	97
5. Study 4 - Lipidomic biomarkers of cardiovascular comorbidities in acromegaly	99
5.1. Introduction	99
5.2. Working hypothesis/objectives	99
5.3. Material and methods	99
5.4. Results	99
5.4.1. Lipidomic profile of hypertensive acromegaly patients	99
5.4.2. Lipidomic profile of acromegaly patients with cardiomyopathy	101
5.4.3. Lipidomic profile of acromegaly patients with heart failure	102
5.5. Discussion	104
5.6. Conclusions	106

6. Study 5 - The role of soluble α-Klotho protein and high-sensitivity C-reactive protein in acromegaly	107
6.1. Introduction	107
6.2. Working hypothesis/objectives	107
6.3. Material and methods	107
6.3.1. Study population	107
6.3.2. Anthropometric measurement	108
6.3.3. Laboratory analysis	108
6.3.4. Imaging of the hypothalamic-pituitary region	109
6.3.5. Statistical analysis	109
6.4. Results	109
6.5. Discussion	117
6.6. Conclusions	122
7. General conclusions	123
8. Originality and innovative contributions of the thesis	125
REFERENCES	127

KEYWORDS: acromegaly, growth hormone-secreting pituitary adenoma, lipidomics, metabolomics, mass spectrometry, high-sensitivity C-reactive protein, soluble α -Klotho protein

INTRODUCTION

Although it is a rare condition, acromegaly often exhibits an unfavorable progression, particularly through cardiovascular and metabolic complications, as well as the risk of neoplasia. Despite the advances in endoscopic transsphenoidal surgery and the development of medication targeting the inhibition of growth hormone (GH) or its receptor blocking, the heterogeneity of therapeutic response remains high. The diversity of therapeutic response observed in acromegaly patients has generated the fundamental idea behind this research.

Thus, the main objective of this thesis was to identify the metabolomic profile of acromegaly and the major altered metabolic pathways. Additionally, the identification of metabolomic biomarkers could potentially contribute to improving the diagnostic management of the disease.

The discrepancy between GH levels and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) often creates difficulties in staging acromegaly. Therefore, the soluble protein α -klotho (α Kl), which appears to be involved in inhibiting the IGF-1 signaling pathway, could be used as a new biomarker for the diagnosis or staging of the disease. Highlighting the role of α Kl in acromegaly was another research topic approached in this study. Lastly, considering the increased frequency of metabolic and cardiovascular complications in acromegaly, it was deemed important to investigate the potential atherogenic implications of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in affected patients.

The first part of the thesis included the current state of knowledge regarding the metabolomics of GH-secreting pituitary adenomas (PA), as well as up-to-date information on α Kl and hsCRP in acromegaly.

The personal contribution of the thesis was presented in five chapters. The first chapter consisted of a systematic review using the PRISMA protocol to evaluate the metabolomic profile of PA and the contributions of magnetic resonance spectroscopy (MRS) and mass spectrometry (MS)-based techniques to these tumors. In the second chapter, the focus was on the metabolomics of GH-secreting PA, presented as a systematic review, aiming to understand the molecular mechanisms of acromegaly. The third chapter consisted of an experimental, cross-sectional study in which 59 patients with active acromegaly and 50 healthy subjects (HS) were

enrolled, which detected the lipidomic profile of active disease using high-performance liquid chromatography performance (HPLC) coupled with MS (HPLC-MS). Based on the initially identified lipidomic profile, untargeted metabolomic analysis quantified the lipidomic biomarkers of active acromegaly. The fourth chapter highlighted the lipidomic biomarkers of cardiovascular comorbidities in acromegaly, using the aforementioned metabolomic technique on a group of 59 acromegaly patients. The last chapter evaluated the serum concentration of α KI and hsCRP using the ELISA method in a cross-sectional study involving 70 acromegaly patients and 30 HS.

The majority of acromegaly patients and HS were enrolled at the Endocrinology Clinic, Cluj County Emergency Clinical Hospital, Romania. However, collaboration with a research team from the Radboud University Medical Center in Nijmegen, the Netherlands (Prof. Dr. Romana Netea-Maier), contributed to the expansion of the study groups. In collaboration with the aforementioned team, I actively contributed to the *ex-vivo* stimulation of whole blood in acromegaly patients for the evaluation of pro-inflammatory cytokines. The joint results of the research on inflammation in acromegaly were published in Growth Hormone & IGF Research in April 2021, under the title "The association between treatment and systemic inflammation in acromegaly" (doi: 10.1016/j.ghir.2021.101391).

The results obtained in this study could contribute to a deeper understanding of the pathogenesis of acromegaly, the development of new therapeutic targets, and the future implementation of personalized medicine in clinical practice. Furthermore, the research topic of this study brings originality, especially at the national level. Internationally, the outcomes of this study add substantial value to the field of metabolomics of acromegaly, particularly through the quantification of palmitoyl dihydrosphingomyelin and phosphatidylcholine as biomarkers of disease activity. This thesis presents for the first time in the literature potential lipid metabolites associated with cardiovascular comorbidities of acromegaly. These include linoleic acid, palmitoleoyl linolenate, ceramide (Cer) (t18:0/20:0(2OH)), and lysophosphatidylinositol (LPI) (16:0).

The main limitation of the thesis was the small size of the study groups, the heterogeneity of the studied biological samples and metabolomic analysis techniques (for systematic reviews), and the cross-sectional design of the three experimental studies.

The five studies included in this work were financially supported by the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca through the doctoral research project no. 1300/50/13.01.2017.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. The metabolomic profile of pituitary adenomas

Introduction: The need for establishing an accurate diagnosis and individualized therapeutic management increasingly demands the approach of personalized medicine in all medical fields. Thus, the use of non-invasive *in vivo* ^1H -MRS technique appears to provide personalized data from various brain tumors, including PA. Furthermore, the development of MS-based techniques, which has taken place in the last decade, will certainly provide the panel of metabolites for each brain pathology and will contribute to the identification of metabolomic biomarkers for diagnosis or prognosis.

Objectives: To review the metabolomic profile and the contributions of metabolomics in PA.

Material and methods: A systematic review was conducted via PubMed, Web of Science Core Collection, and Scopus databases using the following keywords: *metabolomics pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic biomarker pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic analysis pituitary adenoma/tumor*, *metabolomic profile pituitary adenoma/tumor*, *metabolites pituitary adenoma*, *LC-MS pituitary adenoma/tumor*, *GC-MS pituitary adenoma/tumor*, *NMR spectrometry pituitary adenoma/tumor*, *MALDI pituitary adenoma/tumor*, *deoxycholic acid pituitary adenomas*, *4-pyridoxic acid pituitary adenomas*, *phosphoethanolamine pituitary adenomas*, *alanine pituitary*

adenomas, N-acetyl aspartate pituitary adenomas, myo-inositol pituitary adenomas, 3-methyladipate pituitary adenomas, glutamate pituitary adenomas, glutamine pituitary adenomas, taurine pituitary adenomas. Studies conducted on human subjects, written in English, that evaluated the metabolomic profile/metabolomic biomarkers associated with PA or the contribution of MRS and MS-based techniques in PA were eligible.

Results: Eighteen studies enrolling 241 patients with AH were eligible. MS and MRS, which are traditional techniques employed in metabolomics, suggest amino acids metabolism appears to be primarily altered in PA. N-acetyl aspartate, choline-containing compounds and creatine appear as highly effective in differentiating PA from healthy tissue. Deoxycholic and 4-pyridoxic acids, 3-methyladipate, short chain fatty acids (FA) and glucose-6-phosphate unveil metabolite biomarkers in patients with ACTH-secreting PA. Phosphoethanolamine, N-acetyl aspartate and myo-inositol are down regulated in prolactinoma, whereas aspartate, glutamate and glutamine are up regulated. Phosphoethanolamine, taurine, alanine, choline-containing compounds, homocysteine, and methionine were up regulated in unclassified PA across studies. Intraoperative use of ultra high mass resolution matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), which allows localization and delineation between functional PA and healthy pituitary tissue, may contribute to achievement of complete tumor resection in addition to preservation of pituitary cell lines and vasopressin secretory cells, thus avoiding postoperative diabetes insipidus.

Conclusion: Implementation of ultra high performance metabolomics analysis techniques in the study of PA will significantly improve diagnosis and, potentially, the therapeutic approach, by identifying highly specific disease biomarkers in addition to novel molecular pathogenic mechanisms. MALDI-MSI is a helpful tool in the neurosurgical treatment of pituitary tumors. Therefore, metabolomics appears to be a science with a promising prospect in the sphere of PA, and a starting point in pituitary care.

Study 2. Metabolomics - a new perspective in understanding the pathogenesis of acromegaly

Introduction: The therapeutic response heterogeneity in acromegaly persists despite the medical-surgical advances of recent years. Thus, personalized medicine implementation which focuses on each patient is justified. Metabolomics would decipher the molecular mechanisms underlying the therapeutic response heterogeneity. Identification of altered metabolic pathways would open new horizons in the therapeutic management of acromegaly.

Objective: This research aimed to evaluate the metabolomic profile in acromegaly and metabolomics' contributions to understanding disease pathogenesis.

Material and methods: A systematic review was carried out by querying four electronic databases and evaluating patients with acromegaly through metabolomic techniques. The following key word combinations were queried: *acromegaly* or *GH-secreting pituitary adenoma* and *metabolomics, metabolites, metabolomic biomarker, metabolomic fingerprint, metabolomic analysis, metabolomic profile, lipidomics, GC-MS, nuclear magnetic resonance spectrometry, proton magnetic resonance spectroscopy, LC-MS, ¹H-MRS, MALDI, choline, and N-acetyl aspartate.*

Results: Twenty-one studies containing 362 acromegaly patients were eligible. Choline, the ubiquitous metabolite identified in GH-secreting PA by *in vivo* MRS, negatively correlated with somatostatin receptors type 2 (SSTR2) expression and positively correlated with magnetic resonance imaging (MRI) T2 signal and Ki-67 index. Moreover, elevated choline and choline/creatine ratio differentiated between sparsely and densely granulated GH-secreting PA. MRS detected low hepatic lipid content in active acromegaly which increased after disease control. The panel of metabolites of acromegaly deciphered by MS-based techniques mainly included amino acids (especially branched-chain amino acids and taurine), glyceric acid, and lipids. The most altered pathways in acromegaly were the metabolism of glucose (particularly the downregulation of the pentose phosphate pathway), linoleic acid, sphingolipids, glycerophospholipids, arginine/proline, and taurine/hypotaurine. Matrix-assisted laser

desorption/ionization coupled with MS imaging confirmed the functional nature of GH-secreting PA and accurately discriminated PA from healthy pituitary tissue.

Conclusions: Although *in vivo* MRS has quantified choline as the ubiquitous metabolite in GH-secreting PA and has highlighted the decrease in hepatic lipid content in active acromegaly, MS-based techniques seem to provide crucial information in understanding the molecular pathogenesis of the disease. In the future, a deeper understanding of acromegaly pathogenesis through metabolomics will identify new therapeutic targets, thereby improving disease management.

Study 3. The lipidomic profile of active acromegaly identified by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry

Introduction: Lipidomics is a subfield of metabolomics that focuses on the study of the lipidome, which represents the entirety of lipids in an organism. The published lipidomic studies in acromegaly so far are limited. Expanding the research on the lipidome in acromegaly would contribute to a better understanding of the disease's pathogenesis.

Objective: The main aim of this research was to identify the lipidomic profile in active acromegaly using HPLC-MS. Additionally, the study aimed to validate the potential lipidomic biomarkers of the disease.

Material and methods: Fifty-nine patients with active acromegaly and 50 healthy subjects (HS) matched for age, gender, and body mass index (BMI) were enrolled in a cross-sectional study. The study was conducted at two academic centers (Endocrinology Clinic, Cluj County Emergency Clinical Hospital, Romania, and the Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands) from February 2017 to July 2021. The untargeted lipidomic analysis was performed by HPLC-MS.

Results: The acromegaly group consisted of 23 treatment-naive patients and 36 therapeutically uncontrolled patients. The naive group had significantly higher concentrations of IGF-1 and random GH compared to the uncontrolled group ($p < 0.0001$ and $p = 0.0006$, respectively). The period of GH exposure was shorter in the naive group compared to the uncontrolled group ($p < 0.0001$). Additionally, basal glucose, HOMA index, and LDL-cholesterol levels were higher in treatment-naive acromegaly patients compared to uncontrolled patients ($p < 0.05$). Central hypothyroidism and nodular goiter were more frequent in the uncontrolled group compared to the naive group ($p < 0.05$). The lipidomic signature that differentiated acromegaly group from HS included phospholipids and products of their hydrolysis, sphingomyelins (SM), glycerolipids, ceramides, FA and FA esters, as well as steroids and their derivatives. Phosphorylcholine and palmitoyl dihydrosphingomyelin most accurately discriminated the acromegaly group from HS (VIP > 2.3, AUC > 0.93). The concentration of palmitoyl dihydrosphingomyelin was significantly higher in treatment-naive acromegaly patients compared to uncontrolled patients ($p < 0.0001$). The absence of therapy was a prognostic indicator for palmitoyl dihydrosphingomyelin titer. Palmitoyl dihydrosphingomyelin negatively correlated with the period of GH exposure ($r = -0.399$, $p = 0.001$), but positively correlated with IGF-1 ($r = 0.270$, $p = 0.038$) and random GH ($r = 0.434$, $p = 0.000$).

Conclusions: Palmitoyl dihydrosphingomyelin and phosphatidylcholine can be considered potential lipidomic biomarkers of acromegaly. Palmitoyl dihydrosphingomyelin appears to be associated with disease activity.

Study 4. Lipidomic Biomarkers of Cardiovascular Comorbidities in Acromegaly

Introduction: The risk of death in acromegaly patients is over 60% higher compared to the general population, primarily due to cardiovascular comorbidities. Therefore, identifying risk biomarkers for cardiovascular complications could potentially change the therapeutic outlook for these patients.

Objective: The aim of this research was to identify lipidomic biomarkers of cardiovascular comorbidities in acromegaly

Material and methods: described within study 3.

Results: A percentage of 52.54% of acromegaly patients experienced hypertension, with the highest prevalence observed among treatment-naive patients. Additionally, 15.25% of acromegaly patients had associated acromegalic cardiomyopathy, and 13.55% of these individuals presented heart failure (HF). Twelve metabolites discriminated hypertensive acromegaly patients from those with normal blood pressure values ($p < 0.05$). All twelve metabolites were individually entered as independent variables into a stepwise multiple linear regression to identify potential predictors of hypertension in acromegaly. In this regression, linoleic acid, palmitoleoyl linolenate, Cer (t18:0/20:0(20H)), and the waist-to-hip ratio were retained ($R^2 = 0.50$, $F = 12.65$, $p < 0.0001$). Significantly elevated serum concentrations of 12-HETE-GABA/N-nonadecanoyl taurine ($p = 0.037$) and decreased concentrations of LPA (20:1) ($p = 0.040$) were identified among patients with acromegalic cardiomyopathy. Forty-two lipid metabolites discriminated acromegaly patients with HF from those with normal cardiac function. All 42 metabolites were individually entered as independent variables into a stepwise multiple linear regression to identify potential predictors of HF in acromegaly. In this regression, lysophosphatidylinositol (LPI) (16:0) and the duration of GH exposure were retained ($R^2 = 0.40$, $F = 19.16$, $p < 0.0001$).

Conclusions: Linoleic acid, palmitoleoyl linolenate, Cer (t18:0/20:0 (20H)), and LPI (16:0) can be considered prognostic factors for cardiovascular comorbidities in acromegaly.

Study 5. The role of soluble α -Klotho protein and high-sensitivity C-reactive protein in acromegaly

Introduction: GH and IGF-1 measurement is crucial in the diagnosis and monitoring of acromegaly. Identifying potential discrepancies between these two parameters leads to difficulties in disease staging and in making the best therapeutic decisions. Therefore, identifying new diagnostic/prognostic biomarkers would simplify the management of acromegaly. Thus, measuring α Kl could be included in the diagnostic scheme of acromegaly or disease staging, considering that the majority of research in the field has identified high concentrations of this protein in patients with active acromegaly, showing a significant decrease postoperatively. Furthermore, the detection of the role of hsCRP in atherogenesis raises new research directions in cardiovascular pathology, including that associated with acromegaly.

Objectives: The main objective of this research was to investigate the α Kl titer in acromegaly patients based on therapeutic response and to detect potential correlations of α Kl with lipid metabolites identified in study 3. The secondary objective of the research was to evaluate hsCRP concentration in acromegaly patients.

Materials and Methods: 70 acromegaly patients and 30 age and BMI-matched HS were enrolled in a cross-sectional study. The research was conducted within the Endocrinology Clinic, Cluj County Emergency Clinical Hospital from February 2017 to July 2021. The acromegaly group was divided into three subgroups based on therapeutic response, as follows: group A (active patients, $n = 50$) included newly diagnosed patients with high IGF-1 levels and lack of GH suppression post-oral glucose tolerance test (OGTT) ($\text{GH} > 1 \text{ ng/ml}$), as well as treated patients with elevated IGF-1 levels and random GH value exceeding 1 ng/ml ; group B (controlled patients, $n = 15$) included treated acromegaly patients with normal IGF-1 levels and a random GH value $< 1 \text{ ng/ml}$; group C (cured patients, $n = 5$) included patients who were no longer receiving any treatment and had normal IGF-1 levels and adequate GH suppression post-OGTT ($\text{GH} < 1 \text{ ng/ml}$). Serum concentration of α Kl and hsCRP was measured using the sandwich ELISA method.

Results: The most frequent clinical manifestations in group A included acrofacial dysmorphism (94%), visceromegaly (60%), seborrhea (58%), hyperhidrosis (54%), osteoarticular symptoms (52%), and headache (50%). The most frequent cardiovascular comorbidity of the acromegaly group was hypertension, followed by acromegalic cardiomyopathy and HF. A percentage of 46%

of patients with active acromegaly exhibited diabetes mellitus (DM) and prediabetes. A percentage of 72.85% of the acromegaly group presented with pituitary macroadenomas, with 45.71% of them being invasive. Additionally, 75.71% of somatotropinomas displayed hyperintensity in the T2-weighted sequence on pituitary MRI. The serum concentration of IGF-1 and random GH was significantly increased in group A compared to groups B and C. Similarly, the IGF-1 index was significantly higher in group A compared to group B ($p < 0.0001$) and C ($p = 0.0004$). No statistically significant differences were identified in the serum concentration of α KI and hsCRP in acromegaly patients and HS ($p > 0.05$). The serum concentration of α KI and hsCRP was relatively similar between the three study subgroups ($p > 0.05$). A lower serum α KI concentration was observed in diabetic acromegaly patients compared to those with normoglycemia, although without statistical significance ($p = 0.313$). No statistically significant differences in α KI were found between hypertensive and normotensive acromegaly patients ($p = 0.556$). Correlations were not obtained between α KI and IGF-1, random GH, age, or gender of the patients. The most significant correlations between α KI and lipid metabolites identified in study 3 were obtained with the unknown compound with m/z of 443.3338 ($r = -0.5$, $p = 0.000$), LPA (22:5) ($r = -0.48$, $p = 0.000$), and linolenoyl stearate/linolenoyl oleate ($r = -0.45$, $p = 0.000$). No correlations were obtained between hsCRP and IGF-1 or random GH ($r < 0.25$, $p > 0.05$). Hypertensive acromegaly patients exhibited lower hsCRP concentrations compared to normotensive acromegaly patients, but without statistical significance ($p = 0.581$). Similarly, acromegaly patients with DM had lower hsCRP levels compared to normoglycemic acromegaly patients, though without statistically significant differences ($p = 0.086$). Acromegaly patients with hypercholesterolemia had lower hsCRP levels compared to acromegaly patients with normal total cholesterol levels, but no statistically significant difference was detected ($p = 0.430$).

Conclusions: Although numerous studies have suggested a possible inhibitory action of α KI on the IGF-1 signaling pathway, this protein cannot be considered a biomarker of acromegaly, especially in the context of co-association with DM. Other potential factors such as sedentary behavior or impaired renal function might influence the serum α KI level. Thus, the hypothesis of the existence of GH-independent mechanisms in α KI secretion is becoming increasingly evident. Furthermore, hsCRP does not seem to be related to the cardiovascular and metabolic pathology in acromegaly due to its atherogenic effect.

General conclusions

1. The main altered metabolic pathway in PA, using metabolomic analysis techniques, was represented by amino acid metabolism.
2. Choline compounds, N-acetyl aspartate, and creatine best differentiated PA from healthy pituitary tissue using MRS and MS-based techniques.
3. Deoxycholic and 4-pyridoxic acids, 3-methyl adipate, glucose-6-phosphate, and short-chain FA were identified as metabolomic biomarkers in ACTH-secreting PA.
4. Prolactinomas showed high titers of glutamine and glutamate, as well as low titers of phosphoethanolamine, N-acetyl aspartate, and myo-inositol.
5. Non-functional PA presented high titers of phosphoethanolamine, alanine, taurine, homocysteine, methionine, and choline compounds.
6. Intraoperative MALDI-MSI accurately detected the border between PA and normal pituitary tissue. Thus, the widespread use of this technique will improve surgical treatment outcomes in the future. Additionally, MALDI-MSI confirmed the functional nature of AH, including GH-secreting ones, by identifying pituitary hormones and their ionic components.
7. Choline is a ubiquitous metabolite identified in GH-secreting AH by *in vivo* MRS technique, negatively correlating with SSTR2 expression and positively correlating with Ki67 index and T2 hyperintensity on MRI. Furthermore, choline and the choline/creatine ratio differentiated poorly granulated GH-secreting AH from densely granulated ones.
8. MRS detected a low hepatic lipid content in patients with active acromegaly, which increased after achieving disease control.

9. The panel of acromegaly metabolites identified by MS-based techniques included amino acids (especially branched-chain amino acids and taurine), glyceric acid, and lipids.
10. The most altered metabolic pathways in acromegaly included glucose metabolism (particularly the pentose phosphate pathway), linoleic acid metabolism, sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism, arginine/proline metabolism, and taurine/hypotaurine metabolism.
11. The lipidomic profile of active acromegaly identified in our research using HPLC-MS technique included SM, phospholipids and their hydrolyzed products, ceramides, FA and their esters, glycerolipids, carnitines, steroids, and their derivatives.
12. Phosphorylcholine and palmitoyl dihydrosphingomyelin best differentiated patients with active acromegaly from HS and can be considered biomarkers of disease activity. Moreover, palmitoyl dihydrosphingomyelin positively correlated with IGF-1 and random GH levels and negatively correlated with GH exposure duration.
13. Linoleic acid, palmitoyleyl linolenate, Cer (t18:0/20:0(2OH)), and lysophosphatidylinositol (16:0) were predictive factors for cardiovascular complications in active acromegaly.
14. α KI could not be considered a biomarker of acromegaly, especially in the presence of coexisting DM.
15. HsCRP does not seem to contribute to cardiovascular and metabolic impairment in acromegaly through its atherogenic effect.

Originality and innovative contributions of the thesis

Even the choice of theme makes this study original and up-to-date. Thus, the use of a high-performing metabolomics technique, such as HPLC-MS, has accurately identified the lipidomic profile of active acromegaly, subsequently quantifying the lipidomic biomarkers of disease activity and cardiovascular complications. This scientific discovery was a national and international premiere. The general contribution of lipidomic research in acromegaly could potentially lead to the development of new therapeutic targets and the implementation of personalized therapies in clinical practice.

Furthermore, the judicious study of specialized literature has detected the metabolomic/lipidomic fingerprint of PA (including GH-secreting PA), as well as their main altered metabolic pathways. These data will undoubtedly contribute to the understanding of the molecular pathogenesis of these pathologies.

The study of α KI, a relatively recently discovered protein, represented another element of originality in this thesis. Identifying the role of α KI and hsCRP in acromegaly could contribute to a deeper understanding of the cardiovascular and metabolic pathogenesis of the disease.