
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Impactul polimorfismelor receptorului de vitamina D și al dietei bogate în grăsimi asupra modificărilor endocrine și metabolice în sindromul ovarelor polichistice

Doctorand: **Talida Vulcan**

Conducător de doctorat: **Prof. dr. Gabriela Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Cadrul general al bolii	19
1.1. Etiologia și patogeniza PCOS	19
1.2. Manifestări clinice în PCOS	20
1.2.1. Manifestări clinice în hiperandrogenism	20
1.2.2. Disfuncția ovariană și ovarele polichistice	21
1.2.3. Modificări metabolice în PCOS	22
1.3. Vitamina D în PCOS	24
1.4. Polimorfisme ale receptorilor de vitamina D (VDR)	24
1.4.1. Asocierea între PCOS și polimorfismul FokI	24
1.4.2. Asocierea între PCOS și polimorfismul ApaI	25
1.4.3. Asocierea între PCOS și polimorfismul BsmI	26
1.4.4. Asocierea între PCOS și polimorfismul TaqI	27
1.4.5. Asocierea între PCOS și polimorfismul Cdx2	27
1.4.6. Asocierea între PCOS și polimorfismul Tru9I	28
1.5. Influența polimorfismelor receptorului vitaminei D asupra tulburărilor metabolice și endocrine în PCOS	29
1.6. Inflamația și stresul oxidativ în PCOS	29
1.7. Tratamentul în PCOS	30
1.7.1. Tratamentul non-farmacologic în PCOS	31
1.7.2. Tratamentul farmacologic în PCOS	32
1.7.3. Tratamentul chirurgical în PCOS	32
1.8. Modele animale în studiul PCOS	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Ipoteza de lucru	37
2. Metodologie generală	38
3. Studiul 1: Asocierea polimorfismelor genelor receptorului de vitamina D (FokI, ApaI, TaqI), caracteristicile metabolice și susceptibilitatea la PCOS: studiu preliminar caz-control	41
3.1. Introducere	41
3.2. Ipoteza de lucru	42

3.3. Material și metodă	42
3.3.1. Designul studiului	42
3.3.2. Analize antropometrice și biochimice	43
3.3.3. Identificarea polimorfismelor VDR-FokI, VDR-ApaI și VDR-TaqI prin metoda PCR-RFLP	44
3.3.4. Analiza RFLP	44
3.3.5. Analiza statistică	47
3.4. Rezultate	47
3.5. Discuții	53
3.6. Concluzii	56
4. Studiul 2: Impactul polimorfismelor receptorului de vitamină D (FokI, ApaI, TaqI) în corelație cu nivelul hormonal în sindromul ovarelor polichistice	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru	58
4.3. Material și metodă	58
4.3.1. Analiza statistică	59
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	68
4.6. Concluzii	70
5. Studiul 3: Impactul administrării vitaminei D3 și al dietei bogate în grăsimi asupra stresului oxidativ și inflamației în sindromul de ovar polichistic experimental	71
5.1. Introducere	71
5.2. Ipoteza de lucru	72
5.3. Material și metodă	72
5.3.1. Modelul animal	72
5.3.2. Reactivi	72
5.3.3. Design experimental	72
5.3.4. Evaluarea parametrilor metabolici	74
5.3.5. Ultrasonografia ovariană	74
5.3.6. Analiza Western Blot	74
5.3.7. Evaluarea stresului oxidativ	75
5.3.8. Analiza histopatologică	75
5.3.9. Analiza statistică	75
5.4. Rezultate	75

5.5. Discuții	85
5.6. Concluzii	86
6. Concluzii generale	89
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	91
REFERINȚE	93

Cuvinte cheie: sindromul ovarelor polichistice, polimorfisme ale receptorului de vitamina D, FokI, ApaI, TaqI, analiza PCR-RFLP, acnee, hirsutism

INTRODUCERE

Sindromul ovarului polichistic (PCOS) este una dintre cele mai răspândite tulburări endocrine la femeile de vârstă reproductivă, caracterizată prin hiperandrogenism, disfuncție ovulatorie și aspect morfologic al ovarului de tip polichistic.

Vitamina D și receptorii săi joacă un rol important în susceptibilitatea dezvoltării PCOS, dar cu toate acestea impactul polimorfismelor receptorilor de vitamina D (VDR) asupra profilului hormonal și metabolic din această afecțiune este încă incomplet elucidat.

Receptorul de vitamina D (VDR) aparține superfamiliei receptorilor nucleari, fiind un factor de transcripție ligand-dependent. VDR este exprimat în diferite țesuturi, inclusiv în intestin, glande paratiroide, celulele sistemului imunitar, precum și la nivelul componentelor axei hipotalamo-hipofizare sau a tractul reproducător.

Prin studiul de față dorim să evaluăm corelațiile dintre parametrii biochimici, endocrini, metabolici și PCOS în rândul populației, cât și influența polimorfismelor receptorului vitaminei D asupra acestora. De asemenea, vom evalua pe model experimental animal, impactul unei diete bogate în grăsimi administrate pe termen lung, urmată de suplimentarea cu vitamina D asupra aceluiași parametrii endocrini, metabolici, de stres oxidativ și de inflamație.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Cadrul general al bolii

1.1. Etiologia și patogeneza PCOS

Actualmente, diagnosticul PCOS se bazează pe două dintre cele trei criterii acceptate de consensul de la Rotterdam (2003) și anume pe prezența hiperandrogenismului clinic/biochimic asociat cu disfuncție ovulatorie cronică și cu morfologie ovariană polichistică la examinarea ecografică, criteriile luate în considerare după excluderea cauzelor secundare.

Etiologia PCOS este multifactorială și nu este pe deplin înțeleasă până în prezent. Factori precum genetica, hormonii, mediul și chiar dieta joacă un rol important în etiopatogeneza bolii. Principalele mecanisme cunoscute până în prezent sunt reprezentate de modificarea secreției hormonului de eliberare a gonadotropinei, de defecte în sinteza androgenilor pe lângă dezvoltarea rezistenței la insulină (IR) și oprirea în evoluție a dezvoltării foliculilor ovarieni.

1.2. Manifestări clinice în PCOS

Principalele manifestări clinice care apar în PCOS se datorează excesului de androgeni și includ hirsutismul, acneea, seboreea, alopecia androgenică și acanthosisul nigricans. Disfuncția ovariană se manifestă clinic prin neregularitatea ciclurilor menstruale (oligomenoree sau amenoree), acestea fiind de regulă fără ovulație. Dereglările duc la infertilitate la 74% dintre pacientele cu PCOS fără ca acest mecanism să fie cunoscut pe deplin.

Femeile cu PCOS pot dezvolta mai frecvent diabet zaharat de tip II, mai ales cele cu un indice de masă corporală crescut și cu o glicemia bazală modificată. Hiperglicemia este factor declanșator pentru mecanisme patogenetice ce implică stresul oxidativ, mai ales la nivel mitocondrial și reprezintă veriga comună pentru complicațiile diabetului.

1.3. Vitamina D și PCOS

Vitamina D (vitD) este un hormon steroid, sintetizat în principal în piele sub acțiunea radiațiilor ultraviolete de tip B, în timp ce sursele alimentare contribuie cu până la 15-20% din nivelurile sale circulante. Dovezile acumulate până în prezent sugerează că statutul vitD se asociază strâns cu patogeneza IR și a sindromului metabolic la femeile PCOS.

1.4. Polimorfisme ale receptorilor de vitamina D (VDR)

Gena VDR este localizată pe cromozomul 12q13, conține 14 exoni și acoperă peste 75 kb de ADN genomic.

Polimorfismul FokI situat pe exonul 2 al regiunii de codificare a genei VDR, este o tranziție T → C în exon. Unele studii au raportat asocierea cu hormonii androgeni sau nivelele de insulină și vit D, dar variabilitatea mare nu permite formularea unor concluzii certe.

Polimorfismul ApaI este localizat în intronul 8 la capătul 3 al genei VDR. Regiunea 3'-UTR este implicată în stabilitatea ARNm și în procesele post-transcripționale. Rezultatele privind polimorfismul ApaI și asocierea cu PCOS sunt contradictorii, în principal pentru că nu modifică secvența de aminoacizi, dar este implicat în reglarea expresiei genei.

Polimorfismul BsmI este localizat în intronul 8 la capătul 3 al genei, aproape de ApaI. BsmI este cunoscut ca un polimorfism silențios care nu schimbă secvența aminoacizilor. Datorită localizării sale în genă, poate fi implicat în reglarea expresiei genelor prin influențarea stabilității ARNm.

Polimorfismul TaqI este un polimorfism al lungimii fragmentului de restricție situat în exonul 9, foarte aproape de regiunea 3'-UTR ce acționează în special prin modularea stabilității ARNm fără a modifica aminoacidul codificat, generând o mutație asemănătoare cu mutația aminoacidului. Majoritatea studiilor au confirmat relația existentă între polimorfismul TaqI și riscul de PCOS.

Polimorfismul Cdx2 este o secvență guanină-adenină, localizată în zona 1 a promotorului genei VDR și acționează ca și factor de transcripție.

Polimorfismul Tru9I localizat în intronul 8, este un polimorfism adenozină - guanină al genei VDR, mult mai puțin investigat decât variantele menționate mai sus.

1.5. Influența polimorfismelor receptorului vitaminei D asupra tulburărilor metabolice și endocrine în PCOS

În ultimul deceniu, studiile s-au concentrat în special pe gene candidate implicate în steroidogeneză, gene din calea de semnalizare a insulinei, gene implicate în secreția de gonadotropină sau în metabolismul vitaminei D, în încercarea de a spori cunoștințele despre patogeneza PCOS. Descoperirile recente asociază variantele genetice ale genei VDR fie cu susceptibilitatea la boala, fie cu parametrii metabolici și endocrini, dar rezultatele sunt inconsecvente, gena VDR fiind foarte polimorfă, iar frecvențele genotipului fiind variabile între diferite rase.

1.6. Inflamația și stresul oxidativ în PCOS

În PCOS s-a identificat o stare proinflamatorie cronică ce se asociază cu rezistența la insulină, hiperglicemie și dislipidemie. Inflamația este veriga cheie în disfuncția endotelială și duce la ateroscleroză și practic amplifică riscurile pe termen lung asociate PCOS și anume riscurile metabolice și cardiovasculare. În PCOS inflamația și stresul oxidativ sunt în strânsă conexiune, ele se influențează reciproc, orice creștere a inflamației amplifică stresul oxidativ care la rândul său duce la inflamație cu realizarea unui cerc vicios ce se auto întreține și se amplifică.

1.7. Tratamentul în PCOS

În PCOS tratamentul trebuie condus în funcție de fenotipul clinic al paciente și urmărește tratamentul simptomatologiei existente, dar și prevenția sau chiar încetinirea dezvoltării de complicații pe termen lung. Tratamentul poate fi non-farmacologic, farmacologic sau chirurgical.

1.8. Modele animale utilizate în studiul PCOS

Întrucât studierea PCOS pe paciente are limitări etice, s-au realizat modele experimentale animale, care să reprezinte cât mai fidel caracteristicile acestei patologii. S-a dovedit că șobolanii au multe similitudini morfologice și endocrine cu omul, așa încât aceștia fac subiectul multor studii de specialitate, inclusiv al celui prezent.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru

Teza își propune să evalueze interacțiunile multidimensionale între parametrii biochimici, endocrini și metabolici la paciente diagnosticate cu PCOS și să analizeze impactul polimorfismelor genetice ale receptorului de vitamina D asupra componentelor endocrine, metabolice și biochimice, în corelație cu modificările observate clinic (hirsutism, acnee, alopecie androgenică). Totodată, s-a realizat un

model experimental animal, la care s-au studiat modificările parametrilor de stres oxidativ, metabolici și endocrini în prezența dietei hipercalorice, respectiv modificările determinate de administrarea de vitamina D.

2. Metodologie generală

Lucrarea include 2 studii clinice și 1 studiu experimental. Pentru studiile clinice au fost incluse 94 de femei, 46 cu PCOS și 48 femei sănătoase (lot control). Diagnosticul de PCOS s-a bazat pe criteriile Rotterdam. Pentru toți subiecții, s-a măsurat înălțimea și greutatea și s-a calculat indicele de masă corporală. S-au prelevat 10 ml sânge venos, pentru măsurarea trigliceridelor, HDL/ LDL-colesterolului, glucozei și insulinei. De asemenea, s-a calculat indicele de adipozitate viscerală și indicele HOMA-IR. Din sânge, prin tehnica reacției de amplificare în lanță a polimerazei, au fost identificate polimorfismele *VDR-FokI*, *VDR-ApaI* și *VDR-TaqI*.

Pentru studiul experimental animal, s-au utilizat 44 femele Wistar. PCOS a fost indus prin administrare de estradiol valerat. Din săptămâna 5 până în săptămâna 22 au primit fie dietă normală, fie dietă bogată în grăsimi. Ulterior, toate animalele au primit timp de 5 săptămâni vitamina D. La sfârșitul experimentului au fost recoltate probe de sânge pentru măsurarea parametrilor metabolici și de stres oxidativ. S-a recoltat țesut ovarian și țesut grăsos periovarian pentru determinări de stres oxidativ și pentru evaluarea inflamației.

3. Studiu 1. Asocierea polimorfismelor genelor receptorului de vitamina D (*FokI*, *ApaI*, *TaqI*), caracteristicile metabolice și susceptibilitatea la PCOS: studiu preliminar caz-control

Studiul de față a raportat pentru prima dată, asocierea între polimorfismele genei *VDR FokI* și *ApaI* și riscul de PCOS la femeile din România. Polimorfismul *FokI*, în modelul co-dominant, s-a asociat cu un risc semnificativ crescut de dezvoltare a PCOS, în timp ce polimorfismul *VDR-ApaI* s-a asociat cu risc de PCOS doar în modelul dominant. Genotipul /T (f/f) al *VDR-FokI* a fost un marker asociat cu scăderea glicemiei a jeun la femeile cu PCOS. Pornind de la aceste date se poate afirma că sunt necesare studii suplimentare, pe eșantioane mai mari, care să stabilească mai precis rolul funcțional al polimorfismelor genei receptorului vitaminei D și relația cu alți parametri metabolici și endocrini în PCOS, pentru a înțelege mai bine importanța și relevanța studiilor de față.

4. Studiul 2. Impactul polimorfismelor receptorului de vitamină D (*FokI*, *ApaI*, *TaqI*) în corelație cu nivelul hormonal în sindromul ovarelor polichistice

Manifestările cutanate ale PCOS apar devreme în cursul bolii și joacă un rol important în diagnosticul inițial al acesteia și afectează în mod semnificativ calitatea vieții și starea psihologică a pacienților.

Acest studiu demonstrează interacțiunea polimorfismului VDR-FokI cu manifestările cutanate în PCOS. Pornind de la datele obținute, putem afirma că genotipul *FokI* CC are rol protector atât împotriva acneei, cât și a seboreei la femeile cu PCOS și, de asemenea, că genotipul dominant VDR-*TaqI* are rol protector împotriva stresului oxidativ asociat PCOS. Deși polimorfismele VDR nu au fost corelate cu nivelul de androgeni, s-a observat că genotipul *FokI* AG s-a asociat cu un nivel crescut al testosteronului total.

5. Studiul 3. Impactul administrării vitaminei D3 și al dietei bogate în grăsimi asupra stresului oxidativ și inflamației în sindromul de ovar polichistic experimental

Prima parte a experimentului a urmărit dezvoltarea PCOS la lotul II prin administrarea de valerat de estradiol (EV).

La lotul cu PCOS, expresia SOD1 în țesutul ovarian a crescut ca urmare a producției de radicali liberi și a dezechilibrului redox apărut.

Administrarea de vitamina D3 a scăzut semnificativ nivelul insulinei la șobolanii cu dietă hipercalorică (HFD) și la cei cu PCOS. PCOS și HFD sunt asociate cu stres oxidativ și inflamație ovariană, procese patologice parțial atenuate de administrarea de vitamina D3, în special în ceea ce privește activarea NFκB.

6. Concluzii generale

Studiul de față a raportat pentru prima dată asocierea între polimorfismele genei VDR *FokI* și *Apal* și riscul de PCOS. Polimorfismul *FokI*, în modelul co-dominant, s-a asociat cu un risc crescut de dezvoltare a PCOS, în timp ce polimorfismul VDR-*Apal* s-a asociat cu risc de PCOS doar în modelul dominant. Totodată, *FokI* CC are rol protector atât împotriva acneei, cât și a seboreei, iar genotipul dominant VDR-*TaqI* are rol protector împotriva stresului oxidativ asociat PCOS.

Administrarea de vitamină D3 la animale cu PCOS indus experimental a scăzut semnificativ nivelul insulinei la șobolanii cu HFD și la cei cu PCOS. PCOS și HFD sunt asociate cu stres oxidativ și inflamație ovariană, procese patologice parțial atenuate de administrarea de vitamina D3, în special în ceea ce privește activarea NFκB.

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Caracterul original și inovativ al acestei teze este în primul rând legat de studiul multiplilor parametri endocrini și metabolici într-o afecțiune dificil de încadrat și cu o patogeneză complexă, cum este sindrom de ovare polichistice, în corelație cu parametri genetici, mai exact cu polimorfisme ale receptorului de vitamina D, la o populația autohtonă, din România.

Prin studiile și concluziile noastre am făcut primul pas spre un teren încă incomplet elucidat, în ceea ce privește atât asocierea polimorfismelor genetice, cât și a manifestărilor cutanate, endocrine și metabolice cu susceptibilitatea la sindromul ovarelor polichistice.

DOCTORAL THESIS SUMMARY

Impact of vitamin D receptor polymorphisms and high-fat diet on endocrine and metabolic changes in polycystic ovary syndrome

Phd student: **Talida Vulcan**

Scientific coordinator: **Prof. dr. Gabriela Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. General framework of the disease	19
1.1. Etiology and pathogenesis of PCOS	19
1.2. Clinical manifestations in PCOS	20
1.2.1. Clinical manifestations in hyperandrogenism	20
1.2.2. Ovarian dysfunction and polycystic ovaries	21
1.2.3. Metabolic changes in PCOS	22
1.3. Vitamin D in PCOS	24
1.4. Polymorphisms of vitamin D receptors (VDR)	24
1.4.1. Association between PCOS and FokI polymorphism	25
1.4.2. Association between PCOS and ApaI polymorphism	26
1.4.3. Association between PCOS and BsmI polymorphism	27
1.4.4. Association between PCOS and TaqI polymorphism	27
1.4.5. Association between PCOS and Cdx2 polymorphism	28
1.4.6. Association between PCOS and Tru9I polymorphism	29
1.5. Influence of vitamin D receptor polymorphisms on metabolic and endocrine disorders in PCOS	29
1.6. Inflammation and oxidative stress in PCOS	30
1.7. Treatment in PCOS	31
1.7.1. Non-pharmacological treatment in PCOS	32
1.7.2. Pharmacological treatment in PCOS	32
1.7.3. Surgical treatment in PCOS	33
1.8. Animal models in PCOS	35
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. Work hypothesis	38
2. General methodology	41
3. Study 1: Association of vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI, ApaI, TaqI), metabolic characteristics and susceptibility to PCOS: preliminary case-control study	41
3.1. Introduction	41
3.2. Work hypothesis	42
3.3. Material and methods	42
3.3.1. Study design	42
3.3.2. Anthropometric and biochemical analysis	43
3.3.3. Identifying VDR-FokI, VDR-ApaI, Vdr-TaqI polymorphisms through PCR-RFLP method	44
3.3.4. RFLP analysis	44
3.3.5. Statistical analysis	47
3.4. Results	47
3.5. Discussions	53
3.6. Conclusions	56

4. Study 2: The impact of vitamin D receptor polymorphisms (FokI, ApaI, TaqI) in correlation with the hormonal level in polycystic ovary syndrome	57
4.1. Introduction	57
4.2. Work hypothesis	58
4.3. Material and method	58
4.3.1. Statistical analysis	59
4.4. Results	60
4.5. Discussions	68
4.6. Conclusions	70
5. Study 3: the impact of vitamin D3 administration and high-fat diet on oxidative stress and inflammation in experimental polycystic ovary syndrome	71
5.1. Introduction	71
5.2. Work hypothesis	72
5.3. Material and method	72
5.3.1. Animal model	72
5.3.2. Reagents	72
5.3.3. Experimental design	72
5.3.4. Metabolic parameters evaluation	74
5.3.5. Ovarian ultrasonography	74
5.3.6. Western Blot analysis	74
5.3.7. Evaluation of the oxidative stress	75
5.3.8. Histopathological analysis	75
5.3.9. Statistical analysis	75
5.4. Results	75
5.5. Discussions	85
5.6. Conclusions	86
6. General conclusions	89
7. Originality and innovative contributions of the thesis	91
References	93

Key words: polycystic ovary syndrome, vitamin D receptor polymorphisms, FokI, ApaI, TaqI, PCR-RFLP analysis, acne, hirsutism

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most widespread endocrine disorders in women of reproductive age, characterized by hyperandrogenism, ovulatory dysfunction, and polycystic ovarian morphology.

Vitamin D and its receptors play an important role in the susceptibility to the development of PCOS, but nevertheless the impact of vitamin D receptor (VDR)

polymorphisms on the hormonal and metabolic profile in this condition is still incompletely elucidated.

The vitamin D receptor (VDR) belongs to the nuclear receptor superfamily, being a ligand-dependent transcription factor. VDR is expressed in various tissues, including the gut, parathyroid glands, cells of the immune system, as well as components of the hypothalamic-pituitary axis or the reproductive tract.

Through the present study, we want to evaluate the correlations between biochemical, endocrine, metabolic parameters and PCOS among the population, as well as the influence of vitamin D receptor polymorphisms on them. We will also evaluate in an experimental animal model the impact of a long-term high-fat diet followed by vitamin D supplementation on the same endocrine, metabolic, oxidative stress and inflammation parameters.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. General framework of the disease

1.1. Etiology and pathogenesis of PCOS

Currently, the diagnosis of PCOS is based on two of the three criteria accepted by the Rotterdam consensus (2003), namely the presence of clinical/biochemical hyperandrogenism associated with chronic ovulatory dysfunction and polycystic ovarian morphology on ultrasound examination, criteria taken into account after the exclusion of causes secondary.

The etiology of PCOS is multifactorial and not fully understood to date. Factors such as genetics, hormones, environment and even diet play an important role in the etiopathogenesis of the disease. The main mechanisms known to date are represented by the modification of gonadotropin-releasing hormone secretion, defects in androgen synthesis in addition to the development of insulin resistance (IR) and the progressive arrest of ovarian follicle development.

1.2. Clinical manifestations in PCOS

The main clinical manifestations that occur in PCOS are due to excess androgens and include hirsutism, acne, seborrhea, androgenetic alopecia and acanthosis nigricans. Ovarian dysfunction is clinically manifested by the irregularity of menstrual cycles (oligomenorrhea or amenorrhea), which are usually without ovulation. The disturbances lead to infertility in 74% of PCOS patients without this mechanism being fully known.

Women with PCOS may develop type II diabetes more frequently, especially those with an increased body mass index and altered basal blood glucose. Hyperglycemia is a trigger for pathogenetic mechanisms involving oxidative stress, especially at the mitochondrial level, and is the common link for diabetes complications.

1.3. Vitamin D and PCOS

Vitamin D (vitD) is a steroid hormone, synthesized mainly in the skin under the action of ultraviolet B radiation, while dietary sources contribute up to 15-20% of its

circulating levels. Accumulated evidence to date suggests that vitD status is closely associated with the pathogenesis of IR and metabolic syndrome in PCOS women.

1.4. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms

The VDR gene is located on chromosome 12q13, contains 14 exons²² and spans over 75 kb of genomic DNA.

The FokI polymorphism located on exon 2 of the coding region of the VDR gene, is a T→C transition in the exon. Some studies have reported association with androgen hormones or insulin and vit D levels, but the large variability does not allow firm conclusions.

The ApaI polymorphism is located in intron 8 at the 3' end of the VDR gene. The 3'-UTR region is involved in mRNA stability and post-transcriptional processes. The results regarding the ApaI polymorphism and the association with PCOS are contradictory, mainly because it does not change the amino acid sequence, but it is involved in the regulation of gene expression.

The BsmI polymorphism is located in intron 8 at the 3' end of the gene, close to ApaI. BsmI is known as a silent polymorphism that does not change the amino acid sequence. Due to its location in the gene, it may be involved in the regulation of gene expression by influencing mRNA stability.

The TaqI polymorphism is a restriction fragment length polymorphism located in exon 9, very close to the 3'-UTR region that acts in particular by modulating mRNA stability without changing the encoded amino acid, generating a mutation similar to the amino acid mutation. Most studies have confirmed the relationship between the TaqI polymorphism and the risk of PCOS.

The Cdx2 polymorphism is a guanine-adenine sequence located in region 1 of the VDR gene promoter and acts as a transcription factor.

The Tru9I polymorphism is located in intron 8, is an adenosine - guanine polymorphism of the VDR gene, much less investigated than the variants mentioned above.

1.5. Influence of vitamin D receptor polymorphisms on metabolic and endocrine disorders in PCOS

In the last decade, studies have focused particularly on candidate genes involved in steroidogenesis, genes in the insulin signaling pathway, genes involved in gonadotropin secretion or in vitamin D metabolism in an attempt to increase knowledge of PCOS pathogenesis. Recent findings associate genetic variants of the VDR gene with either disease susceptibility or metabolic and endocrine parameters, but results are inconsistent, with the VDR gene being highly polymorphic and genotype frequencies being variable between different breeds.

1.6. Inflammation and oxidative stress in PCOS

In PCOS, a chronic proinflammatory state has been identified that is associated with insulin resistance, hyperglycemia and dyslipidemia. Inflammation is the key link in endothelial dysfunction and leads to atherosclerosis and basically amplifies the long-term risks associated with PCOS, namely metabolic and cardiovascular risks. In PCOS inflammation and oxidative stress are closely connected, they influence each other, any

increase in inflammation amplifies oxidative stress which in turn leads to inflammation creating a vicious circle that self-maintains and amplifies.

1.7. Treatment in PCOS

In PCOS, the treatment must be conducted according to the patient's clinical phenotype and aims to treat the existing symptoms, but also to prevent or even slow down the development of long-term complications. Treatment can be non-pharmacological, pharmacological or surgical.

1.8. Animal models used in the study of PCOS

Since studying PCOS on patients has ethical limitations, experimental animal models have been created to represent the characteristics of this pathology as faithfully as possible. It has been proven that rats have many morphological and endocrine similarities with humans, so they are the subject of many specialized studies, including the present one.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis

The thesis aims to evaluate the multidimensional interactions between biochemical, endocrine and metabolic parameters in patients diagnosed with PCOS and to analyze the impact of vitamin D receptor genetic polymorphisms on endocrine, metabolic and biochemical components, in correlation with the clinically observed changes (hirsutism, acne, alopecia androgenic). At the same time, an experimental animal model was created, in which the changes in oxidative, metabolic and endocrine stress parameters were studied in the presence of a hypercaloric diet, respectively the changes determined by the administration of vitamin D.

2. General methodology

The paper includes 2 clinical studies and 1 experimental study. For the clinical trials, 94 women were included, 46 with PCOS and 48 healthy women (control group). The diagnosis of PCOS was based on the Rotterdam criteria. For all subjects, height and weight were measured and body mass index was calculated. 10 ml of venous blood were taken to measure triglycerides, HDL/LDL-cholesterol, glucose and insulin. Visceral adiposity index and HOMA-IR index were also calculated. VDR-FokI, VDR-ApaI and VDR-TaqI polymorphisms were identified from the blood using the polymerase chain reaction technique.

For the experimental animal study, 44 Wistar females were used. PCOS was induced by administration of estradiol valerate. From week 5 to week 22 they received either a normal diet or a high-fat diet. Subsequently, all animals received vitamin D for 5 weeks. At the end of the experiment, blood samples were collected to measure metabolic parameters and oxidative stress. Ovarian tissue and periovarian adipose tissue were harvested for oxidative stress determinations and inflammation assessment.

3. Study 1. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI, ApaI, TaqI), metabolic characteristics and susceptibility to PCOS: preliminary case-control study

The present study reported for the first time, the association between VDR FokI and ApaI gene polymorphisms and the risk of PCOS in Romanian women. The FokI polymorphism, in the co-dominant model, was associated with a significantly increased risk of developing PCOS, while the VDR-ApaI polymorphism was associated with PCOS risk only in the dominant model. The /T (f/f) genotype of VDR-FokI was a marker associated with decreased fasting blood glucose in women with PCOS. Based on these data, it can be stated that further studies, on larger samples, are needed to establish more precisely the functional role of vitamin D receptor gene polymorphisms and the relationship with other metabolic and endocrine parameters in PCOS, in order to better understand the importance and the relevance of the present studies.

4. Study 2. Impact of vitamin D receptor polymorphisms (FokI, ApaI, TaqI) in correlation with hormone level in polycystic ovary syndrome

Skin manifestations of PCOS appear early in the course of the disease and play an important role in its initial diagnosis and significantly affect the quality of life and psychological state of patients.

This study demonstrates the interaction of the VDR-FokI polymorphism with skin manifestations in PCOS. Based on the data obtained, we can state that the FokI CC genotype has a protective role against both acne and seborrhea in women with PCOS, and also that the dominant VDR-TaqI genotype has a protective role against PCOS-associated oxidative stress. Although VDR polymorphisms were not correlated with androgen level, the FokI AG genotype was observed to be associated with an increased total testosterone level.

5. Study 3. Impact of vitamin D3 administration and high-fat diet on oxidative stress and inflammation in experimental polycystic ovary syndrome

The first part of the experiment followed the development of PCOS in group II by administering estradiol valerate (EV).

In the PCOS group, the expression of SOD1 in the ovarian tissue increased as a result of the production of free radicals and the resulting redox imbalance.

Vitamin D3 administration significantly decreased insulin levels in high-calorie diet (HFD) and PCOS rats. PCOS and HFD are associated with oxidative stress and ovarian inflammation, pathological processes partially alleviated by vitamin D3 administration, especially with regard to NFkB activation.

6. General conclusions

The present study reported for the first time the association between VDR gene FokI and ApaI polymorphisms and the risk of PCOS. The FokI polymorphism, in the co-dominant model, was associated with an increased risk of developing PCOS, while the VDR-ApaI polymorphism was associated with PCOS risk only in the dominant model. At the same time, FokI CC has a protective role against both acne and seborrhea, and the

dominant VDR-TaqI genotype has a protective role against the oxidative stress associated with PCOS.

Administration of vitamin D3 to animals with experimentally induced PCOS significantly decreased insulin levels in HFD and PCOS rats. PCOS and HFD are associated with oxidative stress and ovarian inflammation, pathological processes partially alleviated by vitamin D3 administration, especially with regard to NFkB activation.

7. Originality and innovative contributions of the thesis

The original and innovative character of this thesis is primarily related to the study of multiple endocrine and metabolic parameters in a condition difficult to frame and with a complex pathogenesis, such as polycystic ovary syndrome, in correlation with genetic parameters, more precisely with polymorphisms of the vitamin D receptor, in a native population, from Romania.

Through our studies and conclusions, we have taken the first step towards a still incompletely elucidated field, regarding both the association of genetic polymorphisms and skin, endocrine and metabolic manifestations with susceptibility to polycystic ovary syndrome.