

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

# **Biomarkeri metabolici în patologia tiroidiană: implicații în profilul circadian și expunerea profesională**

---

Doctorand: **Gabriela-Maria PAȘCA (BERINDE)**

---

Conducător de doctorat: **Prof. As. Dr. Doina PICIU**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>1</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII .....</b>	<b>3</b>
1. Cancerul tiroidian: etiologie, diagnostic, factori de risc .....	4
1.1. Introducere.....	4
1.2. Etiologie și mecanisme patogenetice.....	4
1.3. Diagnosticul cancerului tiroidian.....	5
1.4. Factori de risc.....	6
1.5. Managementul integrat al factorilor de risc cu relevanță în medicina muncii.....	11
2. Metabolomica: tehnologie analitică avansată aplicată în diagnosticul și monitorizarea patologiilor tiroidiene.....	12
2.1. Principii ale tehnologiei metabolomice.....	12
2.2. Utilizarea metabolomicii în diagnosticul și monitorizarea cancerului tiroidian.....	13
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....</b>	<b>17</b>
3. Scop și obiective.....	19
4. Metodologie generală.....	19
4.1. Achiziția UHPLC-QTOF-ESI+MS și procesarea datelor.....	21
4.2. Analiza statistică.....	22
5. Studiul 1. Evaluarea riscului cumulativ pentru patologia tiroidiană benignă și malignă pe baza aplicării de chestionare și de matrici de expunere profesională.....	24
5.1. Introducere.....	24
5.2. Obiective.....	25
5.3. Material și metodă.....	26
5.4. Rezultate.....	27
5.5. Discuții .....	34
5.6. Concluzii.....	37
6. Studiul 2. Profilul metabolomic seric și biomarkerii de discriminare între nodulii tiroidieni și carcinomul papilar.....	39
6.1. Introducere.....	39
6.2. Obiective.....	39
6.3. Material și metodă.....	39

6.3.1. Pacienții și designul studiului.....	39
6.3.2. Colectarea și pregătirea probelor.....	41
6.4. Rezultate.....	42
6.4.1. Identificarea moleculelor separate prin UHPLC-QTOF-ESI*MS.....	42
6.4.2. Profiluri metabolomice ce diferențiază grupurile de subiecți PTC față de BT și față de grupul control (C).....	45
6.4.3. Analiza biomarkerilor (curbe ROC și valori AUC).....	47
6.4.4. Analiza căilor metabolice.....	48
6.4.5. Analiza semi-targetată pentru fiecare clasă de molecule implicate în patologia tiroidiană .....	49
6.5. Discuții .....	52
6.6. Concluzii.....	54
7. Studiul 3. Profilul metabolomic urinar și biomarkerii de discriminare între nodulii tiroidieni și carcinomul papilar tiroidian.....	56
7.1. Introducere.....	56
7.2. Obiective.....	56
7.3. Material și metodă.....	56
7.3.1. Pacienții și designul studiului.....	56
7.3.2. Colectarea urinei și pregătirea probelor.....	58
7.4. Rezultate.....	59
7.4.1. Identificarea moleculelor separate prin UHPLC-QTOF-ESI*MS.....	59
7.4.2. Profiluri metabolomice ce diferențiază grupurile de subiecți TC vs B și față de grupul control (C).....	63
7.4.3. Analiza biomarkerilor.....	65
7.4.4. Analiza căilor metabolice.....	66
7.4.5. Abordare metabolomică semi-țintită pentru clase specifice de metaboliți.....	66
7.4.6. Molecule comune și specifice găsite în urină în comparație cu serul.....	70
7.5. Discuții .....	70
7.6. Concluzii.....	73
8. Concluzii generale.....	76
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale.....	78
<b>REFERINȚE.....</b>	<b>80</b>

**Cuvinte cheie: metabolomica, oncometaboliti, disfuncții tiroidiene, cancer tiroidian, expunerea profesională, matrice de expunere, disfuncții circadiene**

## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Berinde GM**, Socaciu AI, Cozma A, Socaciu MA, Petre GE. Thyroid Cancer Diagnostics Related to Occupational and Environmental Risk Factors: An Integrated Risk Assessment Approach. *Diagnostics*. 2022; 12(2): 318. doi:10.3390/diagnostics12020318 *ISI Factor de impact JCR<sub>2022</sub> – 3.00 (studiu cuprins în capitolul 1).*
2. **Berinde GM**, Socaciu AI, Socaciu MA, Petre GE, Socaciu C, Piciu D. Metabolic Profiles and Blood Biomarkers to Discriminate between Benign Thyroid Nodules and Papillary Carcinoma, based on UHPLC-QTOF-ESI+-MS Analysis. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(6): 3495. doi:10.3390/ijms25063495 *ISI Factor de impact JCR<sub>2023</sub> – 4.9 (studiu cuprins în capitolul 7).*
3. **Berinde GM**, Socaciu AI, Socaciu MA, Petre GE, Rajnoveanu AG, Barsan M, Socaciu C, Piciu D. In Search of Relevant Urinary Biomarkers for Thyroid Papillary Carcinoma and Benign Thyroid Nodule Differentiation, Targeting Metabolic Profiles and Pathways via UHPLC-QTOF-ESI+-MS Analysis. *Diagnostics*. 2024; 14(21):2421. doi:org/10.3390/diagnostics14212421 *ISI Factor de impact JCR<sub>2023</sub> – 3.0 (studiu cuprins în capitolul 8).*

## INTRODUCERE

Cancerul tiroidian este o problemă globală, numărul de cazuri fiind în continuă creștere, având un impact major asupra mortalității, morbidității cu o incidență crescândă în întreaga lume. Un loc aparte în cercetările actuale este reprezentat de descoperirea și studierea biomarkerilor tumorali care pot diagnostica și preziona evoluția malignității. S-a demonstrat că numeroase expuneri profesionale și de mediu contribuie la creșterea incidenței cancerului, și în mod explicit afectează și perturbă funcția endocrină. Studiile recente au arătat diferențe semnificative în ceea ce privesc metabolismul nodulilor tiroidieni benigni și maligni, dar se știe mult mai puțin despre relația lor cu factorii profesionali și de mediu. Cel mai frecvent, markerii tumorali sunt evaluați prin măsurarea nivelurilor lor ca biomoleculă în țesuturi sau în biofluide precum sânge, urină și salivă. Biomarkerii tumorali sunt nespecifici (regăsiți în mai multe tipuri de cancer) sau specifici unui anumit tip de cancer, dar ceea ce îi caracterizează în mod condiționat, este prezența lor numai în cazul unor patologii maligne, fiind semnificativ diferiți față de țesuturi normale sau față de profilul lor la persoane sănătoase. În cancerul tiroidian, biomarkerii tumorali pot evidenția diferențe între loturi de pacienți cu patologie benignă și malignă, ca rezultat al stilului de viață, al muncii în medii profesionale cu risc crescut sau asocieri de expunere ocupațională și nonocupațională ca de exemplu, dereglări ale ritmului circadian. În consecință, studiul unor molecule-biomarker (oncometaboliți) specifici cancerului tiroidian, corelați cu expunerea profesională și disfuncțiile circadiene, reprezintă un domeniu de interes științific și terapeutic.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Numeroase date de literatură confirmă faptul că cea mai frecventă malignitate a sistemului endocrin este cancerul tiroidian. Cu toate acestea, nu există încă biomarkeri fiabili și specifici pentru detectarea și stadializarea acestei boli. Biopsia este standardul de aur actual pentru diagnosticul cancerului tiroidian, dar dezavantajele acestei tehnici este demonstrat prin rezultate incerte și incapacitatea de a discrimina diferite carcinoame, necesitând astfel proceduri chirurgicale suplimentare pentru a obține un diagnostic final. Tehnici imagistice precum elastosonografia, pot ajuta la distincția benign-malign a nodulilor, dar insuficiente, fiind nevoie de metode standardizate pentru un diagnostic mai precis.

În prezent, aspirația cu ac fin ghidează managementul pacienților cu noduli tiroidieni. Utilizarea acestei tehnici reduce chirurgia inutilă a tiroidei dar prevalența non-diagnosticului este încă mare.

Studiile din ultimele decenii arată că tumorile în general prezintă un fenotip metabolic unic, metabolomul (ansamblul metaboliților implicați în căi metabolice) reprezintă cel mai „în aval” semnal al activității celulare. Metabolomica vizează diferite clase de molecule cu greutatea moleculară mici, numărul estimat fiind de peste 5000, dar care variază în funcție de tipul de celulă sau de țesut.

Metabolomica își propune analiza globală a metaboliților – molecule cu mase moleculare, mici, (sub 100 Daltoni)- care sunt implicate în diferite căi metabolice la nivel celular și tisular. Tehnicile aplicate în metabolomică includ spectroscopia prin rezonanță magnetică (RMN) și spectrometrie de masă (MS) cuplată cu tehnici de separare, cum sunt gaz cromatografia (GC) și cromatografia lichidă (LC). Aceste tehnici oferă șansa determinării profilului metaboliților și a identificării biomarkerilor noi pentru depistarea precoce a cancerului tiroidian, reducând riscurile chirurgicale. Majoritatea celulelor canceroase folosesc glicoliza aerobă (efect Warburg) pentru a produce energie necesară proliferării și diferențierii celulare. De aceea, metabolomica este considerată „apogeul tehnologiilor omice” întrucât poate evalua cohorte de molecule care pot diferenția un metabolism normal de metabolismul tumoral. Această tehnologie oferă șansa determinării profilului metabolic, a identificării unor biomarkeri pentru depistarea precoce, stadializarea diferitelor patologii tiroidiene, inclusiv a cancerului tiroidian, reducând riscurile procedurilor chirurgicale.

Astfel, metabolomica devine un instrument puternic care implică măsurarea sistematică și concomitentă a mai multor metaboliți, inclusiv nutrienți, medicamente, mediatorii de semnalizare și produși/intermediari metabolici din sânge, urină, extracte de țesut sau alte fluide. Implicit, se pot identifica oncometaboliți și factori determinanți ai tumorigenezei, deschizând oportunități viitoare de îmbunătățire a diagnosticului, monitorizării și tratamentului. Identificarea oncometaboliților are o contribuție importantă la stabilirea diagnosticului și protocoalelor actuale de management al cancerului tiroidian.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### **Studiul 1: Evaluarea riscului cumulativ pentru patologia tiroidiană benignă și malignă pe baza aplicării de chestionare și de matrici de expunere profesională**

**Scop / Obiective:** Obiectivele acestui studiu au fost identificarea factorilor de risc profesionali și extraprofesionali care ar putea fi implicați în etiologia patologiei tiroidiene maligne, utilizând chestionare și codul COR (Clasificarea Ocupațiilor din România), adaptat după modelul internațional (Standard Occupational Classification System SOC) cu scopul obținerii unei matrici de expunere profesionale cât mai complexe care să permită analizarea și compararea ocupațiilor din diferite domenii de activitate în ceea ce privește riscul de cancer tiroidian.

**Material și metode:** Studiul s-a desfășurat pe două loturi de subiecți, unul cu patologie tiroidiană benignă, iar celălalt cu patologie tiroidiană malignă, selectați la momentul prezentării pentru diagnostic și/sau tratament la Clinica Chirurgie IV Cluj-Napoca în perioada octombrie 2022 și februarie 2023. Am obținut un număr total de 61 de pacienți diagnosticați cu diferite patologii tiroidiene: care au completat o serie de

chestionare prin interviu direct sau prin interviu telefonic. Pentru fiecare loc de muncă menționat în chestionar, a fost alocat un cod COR, corespunzător ocupației respective.

**Rezultate:** Dintre cei 61 de pacienți cu patologie tiroidiană incluși în studiu, 24 au fost diagnosticați cu diverse tipuri de cancer tiroidian și incluși în grupul TC (thyroid cancer) carcinom tiroidian papilar (22), carcinom folicular (1), medular (1) și anaplazic (1) și 37 de subiecți au fost confirmați cu patologii tiroidiene benigne, alcătuind grupul BT (benign thyroid), gușa nodulară (34), tiroidită Hashimoto (2) și adenom folicular oncocitar (1). Toate cazurile au fost confirmate histologic.

Vârsta medie a pacienților a fost similară între cele două loturi. A existat un procent mic de reprezentanți ai sexului masculin, 12.5% pentru TC, respectiv 10.81% pentru BT. Cei mai mulți participanți au avut un IMC anormal, date semnificativ statistice s-au înregistrat pentru lotul BT, 20 de pacienți s-au încadrat în categoria supraponderal, comparativ cu lotul TC ( $p=0.0347$ ) precum iar categoria obezitate grad 2 în lotul TC ( $p=0.0231$ ). În ceea ce privesc antecedentele heredo-colaterale de cancer tiroidian, obiceiul de fumător și consumul de alcool, nu s-au obținut diferențe semnificative statistic. S-a analizat relația dintre expunerea la factori de risc întâlniți în mediul casnic, dar fără a fi observate diferențe semnificative statistic între loturi. Pentru analiza factorilor de risc ocupaționali, conform clasificării ocupațiilor din România (COR), s-au luat în considerare cele 9 grupe ocupaționale majore, subdivizate ulterior în subgrupe majore și suplimentar în grupe minore. Din grupul TC, doar o singură persoană nu a avut activitate profesională, vs 3 persoane din grupul BT, cu o vechime medie foarte apropiată între cele 2 loturi (24 ani pentru TC vs 25.5 ani pentru BT). În cazul pacienților TC, nu au existat reprezentanți ai grupelor majore 6 și 8, grupul BT fiind reprezentat în toate domeniile COR. În grupele majore 1, 4 și am avut un număr egal de reprezentanți TC și BT.

Cea mai mare diferență în ce privește numărul de angajați a fost înregistrată în grupele 5, unde lotul BT a fost mai mult reprezentat (12 vs 7 angajați) și 9, unde am identificat un număr mai mare de subiecți în lotul TC (8 vs 6 angajați). Pentru grupele majore 2 și 3 au existat diferențe minore, cu un reprezentant în plus pentru fiecare dintre cele 2 grupe în cazul pacienților BT.

În grupul BT am avut un număr mai mare de subiecți care și-au început activitatea profesională înaintea vârstei de 18 ani (11 BT vs 5 TC). În lotul TC, majoritatea (80%) au avut suprasolicitare neuro-psiho-senzorială pe o perioadă mai mare de 7 luni prin tură de noapte, vs. 100% în grupul BT.

**Concluzii:** Chestionarele utilizate au avut ca scop analiza factorilor de risc ocupaționali și generali (non-ocupaționali), rezultatele obținute au fost procesate prin matrici de expunere complexe, pentru a identifica locurile de muncă sau profesiile cu risc crescut. Fiecare ocupație a fost asociată cu un cod COR specific, pentru a stratifica riscul cumulativ individual și a permite compararea riscurilor între diferite domenii de activitate. Au fost identificate profesii cu risc crescut cu expunere la agenți chimici din categoria detergenților și dezinfectanților, precum cei din domeniul curățeniei și

întreținerii clădirilor, spațiilor de birouri sau spațiilor auxiliare industriale. Expunerea la substanțe perturbatoare endocrine din mediul casnic nu a influențat semnificativ riscul de cancer tiroidian. Au fost identificate profesii unde s-a constatat un număr mare de cazuri de cancer tiroidian, precum cele de economist, contabil, personal administrativ, dar și profesii din diverse ramuri industriale, precum muncitori din industria textilă, industria încălțămintei și industria maselor plastice.

## **Studiu 2. Profilul metabolomic seric și biomarkerii de discriminare între nodulii tiroidieni și carcinomul papilar**

**Scop / Obiective:** Scopul acestui studiu a fost stabilirea profilului metabolomic seric și identificarea unor biomarkeri serici specifici de discriminare între nodulii tiroidieni (BT) și carcinomul papilar (PTC). Astfel s-a urmărit obținerea unei imagini fiabile a fiziopatologiei tiroidiene bazată pe metabolomică, care poate elucida mecanisme moleculare modificate, caracteristice acestor patologii, care implică clase specifice de metaboliți. Obiectivele acestui studiu au inclus: stabilirea profilului metabolomic seric al pacienților diagnosticați cu PTC și BT comparativ cu martori sănătoși (C) (1), de a identifica biomarkeri potențiali de diferențiere pe baza analizei metabolomice avansate și a statisticii multivariate și univariate ANOVA (2), pentru a evidenția căile metabolice afectate în fiecare patologie (benigne și maligne) (3)

**Material și metode:** Loturile studiate au fost reprezentate de 81 subiecți sănătoși (grupul C) și 55 de pacienți diagnosticați cu diferite patologii tiroidiene benigne și maligne au fost incluși în studiu. Colectarea probelor de ser a avut loc în perioada octombrie 2022 - februarie 2023. Sângele a fost recoltat prin puncție venoasă în vacutainere sterile fără anticoagulant și serul a fost păstrat la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la analiză. Probele au fost etichetate folosind coduri numerice confidențiale. S-a adăugat un volum de 0,8 mL amestec de metanol pur de calitate HPLC și acetonitril (2:1 v/v) pentru fiecare volum de 0,2 mL ser. În fiecare caz, amestecul a fost agitat în vortex timp de 5 minute pentru a precipita proteinele și a fost depozitat 24 de ore la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Supernatantul colectat după centrifugare la 12.500 rpm timp de 10 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) a fost filtrat prin filtre de nailon (0,25  $\mu\text{m}$ ) introduse în microfiole de sticlă și plasat în autosampler-ul cromatografului lichid de ultra-înaltă performanță (UHPLC) chiar înainte de injectare. Probele de control al calității (QC) au fost făcute în paralel: 10  $\mu\text{l}$  au fost prelevați din fiecare probă și adăugați în microtuburi Eppendorf (Eppendorf Corporation, Germania) de 2 ml, vortexați și împărțiți în 0,2 ml pentru fiecare tub și pretratați folosind aceeași procedură pentru a îmbunătăți calitatea datelor pentru profilarea metabolică.

**Rezultate:** Conform datelor brute obținute prin procedurile analitice UHPLC-TOF-ESI<sup>+</sup>-MS, au fost separate 386 de molecule. Dintre acestea, au fost identificate 166 molecule clasificate în 10 clase de metaboliți.

Analiza statistică a evidențiat diferențe semnificative între grupurile C vs PTC+BT și mai puțin între PTC vs BT cu o covarianță de 32,1%. Primele 15 molecule cu scoruri

VIP>1,5 și scoruri MDA au fost considerate semnificative pentru diferențierea între grupuri. Heatmap arată un număr de 16 molecule cu niveluri scăzute în grupurile PTC și BT comparativ cu martorii și 9 molecule cu niveluri crescute în PTC și BT (prag  $p < 0,05$ ). Conform datelor prezentate, 9 molecule au avut valori scăzute în grupurile TC și BT comparativ cu C. Acestea au fost LysoPA(18:2), LysoPE(20:4) acidul arahidonic (C20:4), tetrahidrocortizol, acidul taurocolic, LysoPC(20:3), acidul inozinic, LysoPC(22:5), selenometionină. Similar, când s-au comparat doar grupurile PTC cu C, în grupul PTC s-au identificat niveluri scăzute pentru acidul taurocolic, dihidrocortizol, S-adenosilmetionina, adenosin monofosfat, tetrahidrocortizol, LysoPE(20:4), LysoPC(20:3) și valori crescute LysoPC(16:0), homocisteină, timină, 5-hidroxilizină, fenilalanină. Astfel, 12 molecule au avut niveluri scăzute în PTC vs BT și 13 molecule cu niveluri crescute în TC ( $p < 0,05$ ). Conform algoritmului de analiză a biomarkerilor, s-au obținut curbele ROC pentru a evalua capacitatea de diagnosticare a unui biomarker și s-au evaluat ariile de sub curbe (AUC). Valorile mari, ale AUC evidențiază care sunt cei mai buni biomarkeri de diferențiere între grupurile PTC vs C și PTC vs BT. Conform valorilor AUC, diferențierea dintre PTC și grupul C a fost mai mare (valori AUC peste 0,966 pentru 17 molecule) față de diferențierea PTC vs BT, cu valori variind de la 0,730 la 0,644 în cohorta de molecule selectate.

Pe baza aceluiași software Metaboanalyst, cohorta de molecule separate și identificate, de la toți subiecții, au fost supuse analizei Pathway luând în considerare căile metabolice afectate de patologii tiroidiene țintite în acest studiu. Au fost identificate 10 clase de molecule implicate în căi metabolice specifice. Pentru fiecare clasă, s-au efectuat analize statistice univariate ANOVA, cu determinarea scorurilor PLSDA și VIP, analiza RF și hărțile termice (Heatmap).

Rezultatele analizei căii metabolice arată un comportament specific al diferitelor clase de metaboliți, identificând fie structuri metabolice comune ale PTC și BT, fie modificări specifice, pentru fiecare grup patologic, comparativ cu grupul martor C.

**Concluzii:** Metabolomica bazată pe HPLC-QTOF-ESI+-MS poate distinge pacienții cu patologie tiroidiană (cancer sau benign) de subiecții sănătoși. Utilizarea analizei HPLC-QTOF-MS ca metodă precisă pentru profilarea metaboliților neținți, cuplată cu modele statistice avansate, disponibile online, Metaboanalyst 5.0. platformă care ajută la aplicarea diferitelor analize complementare (de la statistici de bază multivariate și univariate, la analiza biomarkerilor și analiza căii). Biomarkeri specifici ai diferențierii dintre PTC și BT au fost identificați în fiecare clasă de metaboliți, supraexprimați sau subexprimați comparativ cu martorii, implicați în fiziopatologia și căile metabolice specifice.

### **Studiul 3. Profilul metabolomic urinar și biomarkerii de discriminare între nodulii tiroidieni și carcinomul papilar tiroidian**

**Scop / Obiective:** Obiectivele acestui studiu au inclus: stabilirea profilului metabolomic urinar al pacienților diagnosticați cu carcinom papilar (grup PTC), cu

patologie benignă (grup BT) comparativ cu martori sănătoși (C) (1), identificarea biomarkerilor potențiali de diferențiere pe baza analizei metabolomice și a statisticii multivariate și univariate ANOVA (2), evidențierea căilor metabolice afectate în fiecare patologie (benigne și maligne) (3), comparația datelor obținute din probele de urină și ser, folosind algoritmul Venny și statistica multivariată, pentru a identifica biomarkerii comuni și specifici din aceste biofluide (4).

**Material și metode:** Pacienții și designul studiului. Consimțământul informat scris a fost obținut de la toți subiecții. Un număr total de 20 de subiecți sănătoși (grupul C) și 60 de pacienți diagnosticați cu diferite patologii tiroidiene: carcinoame în principal papilar au fost incluși în grupul PTC (n=30), și în grupul BT (n= 30) pacienții cu patologii tiroidiene benigne incluzând în principal gușă nodulară (GN) confirmată cu hipotiroidism clinic (HT). Probele de urină au fost recoltate în paralel cu probele de sânge în perioada octombrie 2022 și februarie 2023 de la Clinica Chirurgie IV Cluj-Napoca. Probele de urină au fost colectate din prima urină de dimineață în flacoane sterile și păstrate, după adăugarea a 0,1% azidă de sodiu în congelator la -20°C. S-a adăugat un volum de 0,8 ml amestec de metanol pur de calitate HPLC și acetonitril (2:1 v/v) pentru fiecare volum de 0,2 ml de urină. Amestecul a fost agitat în vortex, timp de 5 minute și depozitat timp de 24 de ore la -20°C pentru a stimula precipitarea proteinelor. După centrifugare la 12.500 rpm timp de 10 minute (4°C), supernatantul a fost colectat, filtrat prin filtre de nylon (0,2 μm) și introdus în microfiole de sticlă înainte de injectarea în sistemul LC-MS (cromatograful de lichide de ultra-înaltă performanță). Probele UHPLC de control al calității (QC) au fost realizate în paralel, preluând câte 10 μl din fiecare probă.

**Rezultate:** Conform datelor brute obținute prin procedurile analitice UHPLC-TOF-ESI+-MS, au fost separate 386 de molecule. Dintre acestea, au fost identificate 190 molecule care au fost clasificate în 10 clase de metaboliți.

Conform diagramei PLSDA s-a diferențiat semnificativ grupul C față de grupurile PTC și BT, cu o covarianță de 33,3% iar diagrama PLSDA arată o diferențiere semnificativă, dar mai puțin evidentă, între grupul BT și PTC, cu o co-varianță de 32,1%. Scorurilor VIP arată topul primelor 15 molecule care pot explica diferențierea dintre grupurile PTC, BT și C. Cele mai semnificative diferențe au fost observate pentru guanozină, 6-hidroximelatonină, acid homogentisic, homocisteină (cu niveluri mai scăzute în grupul TC, opus grupului B) și acidul taurocolic (cu niveluri mai mari în grupul TC). Aceste date au fost corelate cu statistici complementare. Pentru a evidenția diferențe între grupul B respectiv TC, graficul analizei Random Forest este util pentru o clasificare adecvată a biomarkerilor iar harta termică evidențiază creșterea sau scăderea relativă a nivelurilor metaboliților semnificativi.

Au fost observate niveluri crescute de hidroxitriptamină și N-acetil triptofan pentru grupul TC comparativ cu grupul B. Harta termică ilustrează 25 de molecule cu niveluri crescute (17) sau scăzute (8) în grupul TC în comparație cu grupul B (p < 0,05).

Aplicând Analiza Volcano plot, valorile Fold change  $>0,5$  și  $\log_2(\text{FC})$  au arătat o evaluare semi-cantitativă a celor mai semnificative diferențe dintre loturile TC și B. Au fost observate scăderi semnificative ale acidului dihidroxibutiric și nicotinuric în grupul TC, creșteri semnificative ale glicerofosfocolinei, serotoninei, acidului 12-cetodeoxicolic, leucinei, acidului taurocolic, LysoPE 22:0 și butenilcarnitinei.

Analiza Biomarkerilor a fost aplicată pentru a obține curbele ROC și valorile AUC (0-1) care reflectă diferențierea între grupurile TC și B și au fost comparate cu valorile obținute la probele de ser sangvin, de la grupuri similare. Valorile AUC pentru primele 10 molecule au variat între 0,730 și 0,650. Conform acestor date în urină, în principal molecule lipidice, cum ar fi LisoPE (22:6) și LisoPE(22:0), acidul mevalonic, dihidrocortizolul, glicerofosfocolina, androsteronul, 19-norandrosteronul au prezentat valori AUC superioare, în timp ce în sânge, LisoPA (18:2) și LisoPE(20:4), derivații de aminoacizi (taurină, acetilcisteină), acil carnitine sunt mai bine reprezentați ca biomarkeri.

Cohorta de molecule separate și identificate în toate grupurile au fost supuse analizei căilor metabolice afectate și valoarea impactului (prag  $p < 0,05$ ).

În urină, impact semnificativ a fost identificat pentru metabolismul hormonilor steroidici, a tioaminoacizilor, a triptofanului, alaninei, aspartatului și glutamatului. În general, valorile impactului au fost mai mici în urină, comparativ cu serul sangvin. Zece clase diferite de metaboliți au fost implicați în căi metabolice specifice și s-au evidențiat modificări ale metabolismului glucidic și al aminoacizilor, derivați de butirac și selenocomplecși de metionină și cisteină, modificări ale nivelurilor de nucleotide și nucleozide, ale acizilor biliari cu niveluri crescute ale unor acizi grași liberi nesaturați în cele două grupuri în comparație cu martorii, implicarea unui număr semnificativ de acilcarnitine și prostaglandine între cele trei grupuri B, TC și C, Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele obținute prin Analiza căilor, identificând fie căi metabolice comune ale TC și B, fie modificări specifice pentru fiecare grup patologic, în comparație cu martorii.

Având în vedere moleculele identificate în urină ( $n=190$ ) și în ser ( $n=166$ ), conform datelor noastre anterioare [139] a fost aplicat algoritmul Venny 2.1 și s-au găsit 90 de molecule comune precum și molecule specifice în urină ( $n=100$ ) și ser ( $n=76$ ).

**Concluzii:** Folosind metabolomica neșintă bazată pe tehnologia UHPLC-QTOF-ESI+-MS, probele de urină de la pacienții diagnosticați cu carcinom tiroidian și gușă nodulară benignă au fost comparate cu subiecți sănătoși. Biomarkerii specifici presumtivi ai diferențierii au fost identificați prin statistică multivariată și univariată furnizată de platforma integrată Metaboanalyst 6.0. Datele obținute au fost comparate cu profilurile metabolice serice obținute de la aceiași pacienți. Au fost vizate și comparate, prin analiză semitargetată zece clase diferite de metaboliți, în comparație cu martorii. În mod diferențiat aceste clase de metaboliți au arătat diferențe între grupurile de subiecți cu cancer papilar și gușa multinodulară. Analiza metabolomică a identificat căile metabolice afectate, și anume metabolismul moleculelor polare (metaboliții specifici

glicolizei, aminoacizi, și complecși cu seleniu, metaboliți purinici și pirimidinici), dar mai ales metabolismul lipidic (biosinteza acizilor grași, acilcarnitine și acizi biliari, hormoni steroidici), relevanți pentru gasirea biomarkerilor legați de carcinomul tiroidian sau nodulii benigni.

## CONCLUZII GENERALE

Patologia tiroidiană și implicit cancerul tiroidian, reprezintă o problemă majoră de sănătate la nivel global, fiind cauzată de factori multipli, inclusiv expunerea profesională și modificări ale profilului circadian. În acest context, teza de doctorat abordează un domeniu de interes științific și terapeutic, prin studierea unor aspecte noi, privind identificarea de molecule-biomarker care reflectă dereglări ale unor căi metabolice specifice, evidențierea unor oncometaboliți specifici cancerului tiroidian, corelați cu expunerea profesională. Cele trei studii efectuate pornind de la un design experimental complex, au putut conduce prin rezultatele obținute la câteva concluzii generale cu impact științific și în practica clinică.

1. S-a evidențiat un risc crescut de cancer tiroidian în rândul personalului expus profesional la noxe chimice, în timp ce expunerea la substanțe perturbatoare endocrine din mediul casnic nu a influențat semnificativ riscul de cancer tiroidian.
2. Prin utilizarea tehnologiei metabolomice asistate de cromatografia de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (UHPLC-MS) s-a stabilit profilul metabolic seric al pacienților din loturi diagnosticate cu patologie tiroidiană benignă și malignă, comparativ cu martorii sănătoși, fiind identificați biomarkeri specifici de diferențiere implicați în cai metabolice specifice fiind vizat metabolismul glucidic, lipidic și al aminoacizilor.
3. Prin utilizarea comparativă a metabolomicii netargetată și semi-targetată pe categorii de metaboliți din sânge și urină, cu evidențierea biomarkerilor specifici celor două patologii precum și a profilului metabolic diferențiat din sânge și respectiv urină, s-au evidențiat metaboliți comuni sau specifici în fiecare grup de pacienți, inclusiv pe cele 10 clase distincte de molecule.
4. Rezultatele analizelor metabolomice au confirmat afectarea și reprogramarea unor căi metabolice, îndeosebi în cazul cancerului tiroidian. Astfel, s-a evidențiat afectarea metabolismul energetic (condiționat de hormonii tiroidieni în cazul patologiei benigne) și prin reprogramare metabolică în cazul cancerului tiroidian. A fost afectat îndeosebi metabolismul glucidic, prin alterarea căii glicolitice și a biosintezei aminoacizilor, îndeosebi a triptofanului și kynureninei, precursori și reglatori ai unor neurotransmitători și cytokine. De asemenea, au fost identificate modificări ale precursorilor din sinteza nucleotidelor.
5. În cazul probelor de urină s-au identificat biomarkeri comuni sau specifici cu cei evidențiați în sânge, îndeosebi referitor la metabolismul moleculelor polare

(metaboliții specifici glicolizei, aminoacizi, și complecși cu seleniu, metaboliți purinici și pirimidinici), dar și biosinteza acizilor grași, acilcarnitine și acizi biliari, hormoni steroidici, fosfolipide și prostaglandine) relevant ca biomarkeri tumorali comparativ cu nodulii benigni.

6. S-au identificat prin analiza semitargetată zece clase diferite de metaboliți și căile metabolice implicate, dintre acestea căile metabolice afectate implicând metabolismul moleculelor polare (metaboliți purinici și pirimidinici, aminoacizi, complecși de seleniu) dar și metabolismul lipidic fiind implicate biosinteza acizilor biliari, acizilor grași, acilcarnitinele, fosfolipide, prostaglandine, hormoni steroizi care sunt mai relevante în diferențierea celor două loturi de patologii tiroidiene.
7. Nivelul de seleniu din complecși cu cisteină și metionină, a fost statistic semnificativ scăzut în lotul cu patologie malignă, cât și în cel cu patologie benignă comparativ cu martorii.

Evidențierea acestor biomarkeri specifici din sânge și urină, corelați cu matricea de evaluare a riscurilor ocupaționale și non-ocupaționale, poate contribui la identificarea și instaurarea unor programe de prevenție bine țintite pe medii profesionale.

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE**

Primul studiu din România, având ca obiectiv utilizarea matricelor de expunere profesională pentru a evidenția riscurile asociate cu patologia tiroidiană malignă și benignă, nemaifiind realizat până în prezent. În contextul creșterii incidenței patologiei tiroidiene chestionarul complex realizat a inclus factori de risc nemodificabili, precum și factori de risc modificabili, acordându-se o atenție specială expunerii profesionale. El reprezintă o premieră în domeniul patologiilor tiroidiene din țara noastră și se numără printre puținele cercetări raportate în literatură, în special datorită corelațiilor propuse între datele de metabolomică, expunerea profesională și profilul circadian al pacienților investigați. S-au realizat și optimizat protocoale de lucru în analiză metabolomică, anterior validate prin studii pe biofluide de la pacienți cu diferite tipuri de cancer (colorectal, hepatic, de sân sau de prostată), aplicate acum și pe cancerul tiroidian. Studiile efectuate au permis realizarea de comparații și identificări ale biomarkerilor comuni din sânge și urină, utilizând algoritmi actualizați de biostatistică prin platforma *online* Metaboanalyst 5.0. Un aspect inovativ îl reprezintă și studiul metabolismul urinar în comparație cu cel seric la pacienți cu patologii tiroidiene, până în prezent fiind publicată doar o singură lucrare în acest sens. Metaboliții selectați și căile metabolice afectate în cele două tipuri de patologii pot fi indicatori și biomarkeri de predicție a cancerului tiroidian și pot optimiza protocoalele actuale de diagnostic și management al acestei patologii, contribuind la identificarea și implementarea unor programe de prevenție direcționate, adaptate diferitelor medii profesionale.

---

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

# Metabolic biomarkers in thyroid pathology: implications in the circadian profile and occupational exposure

---

Ph D: **Gabriela-Maria PAȘCA (BERINDE)**

---

Ph D supervisor: **Prof. As. Dr. Doina PICIU**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## THE CONTENTS OF THE DOCTORAL THESIS

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE .....</b>	<b>3</b>
1. Thyroid cancer: etiology, diagnosis, risk factors .....	4
1.1. Introduction.....	4
1.2. Etiology and pathogenetic mechanisms .....	4
1.3. Diagnosis of thyroid cancer .....	5
1.4. Risk factors.....	6
1.5. Integrated management of risk factors with relevance in occupational medicine	11
2. Metabolomics: advanced analytical technology applied in the diagnosis and monitoring of thyroid pathologies .....	12
2.1. Principles of metabolic technology .....	12
2.2. The use of metabolomics in the diagnosis and monitoring of thyroid cancer.....	13
<b>PERSONAL CONTRIBUTION.....</b>	<b>17</b>
3. Purpose and objectives.....	19
4. General methodology.....	19
4.1. UHPLC-QTOF-ESI+MS acquisition and data processing.....	21
4.2. Statistical analysis.....	22
5. Study 1. Cumulative risk assessment for benign and malignant thyroid pathology based on the application of questionnaires and occupational exposure matrices .....	24
5.1. Introduction.....	24
5.2. Objectives.....	25
5.3. Material and method.....	26
5.4. Results.....	27
5.5. Discussions .....	34
5.6. Conclusions.....	37
6. Study 2. Serum metabolic profile and biomarkers of discrimination between thyroid nodules and papillary carcinoma .....	39
6.1. Introduction.....	39
6.2. Objectives.....	39
6.3. Material and method.....	39

6.3.1. Patients and study design .....	39
6.3.2. Collection and preparation of evidence .....	41
6.4. Results.....	42
6.4.1. Identification of molecules separated by UHPLC-QTOF-ESI+MS .....	42
6.4.2. Metabolic profiles that differentiate the PTC groups from BT and control group (C).....	45
6.4.3. Analysis of biomarkers (ROC curves and AUC values).....	47
6.4.4. Analysis of metabolic pathways .....	48
6.4.5. Semi-targeted analysis for each class of molecules involved in thyroid pathology .....	49
6.5. Discussions.....	52
6.6. Conclusion.....	54
7. Study 3. Urinary metabolic profile and biomarkers of discrimination between thyroid nodules and thyroid papillary carcinoma .....	56
7.1. Introduction.....	56
7.2. Objectives.....	56
7.3. Material and method.....	56
7.3.1. Patients and study design .....	56
7.3.2. Urine collection and sample preparation .....	58
7.4. Results.....	59
7.4.1. Identification of molecules separated by UHPLC-QTOF-ESI+MS .....	59
7.4.2. Metabolic profiles that differentiate TC vs B groups from control (C).....	63
7.4.3. Biomarker analysis .....	65
7.4.4. Analysis of metabolic pathways .....	66
7.4.5. Semi-targeted metabolic approach for specific classes of metabolites .....	66
7.4.6. Common and specific molecules found in urine compared to serum .....	70
7.5. Discussions.....	70
7.6. Conclusions.....	73
8. General conclusions.....	76
9. Originality and innovative contributions of doctoral research .....	78
<b>REFERENCE.....</b>	<b>80</b>

**Key words: metabolism, oncometabolites, thyroid dysfunction, thyroid cancer, occupational exposure, exposure matrix, circadian dysfunction**

## LIST OF PUBLICATIONS

### Articles published *in extenso* as a result of doctoral research

1. **Berinde GM**, Socaciu AI, Cozma A, Socaciu MA, Petre GE. Thyroid Cancer Diagnostics Related to Occupational and Environmental Risk Factors: An Integrated Risk Assessment Approach. *Diagnostics*. 2022 ; 12(2): 318. doi:10.3390/diagnostics12020318 *ISI Impact Factor JCR<sub>2022</sub> – 3.00 (study in chapter 1)*.
2. **Berinde GM**, Socaciu AI, Socaciu MA, Petre GE, Socaciu C, Piciu D. Metabolic Profiles and Blood Biomarkers to Discriminate between Benign Thyroid Nodules and Papillary Carcinoma, based on UHPLC-QTOF-ESI+-MS Analysis. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(6): 3495. doi:10.3390/ijms25063495 *ISI Impact Factor JCR<sub>2023</sub> – 4.9 (study in chapter 7)*.
3. **Berinde GM**, Socaciu AI, Socaciu MA, Petre GE, Rajnoveanu AG, Barsan M, Socaciu C, Piciu D. In Search of Relevant Urinary Biomarkers for Thyroid Papillary Carcinoma and Benign Thyroid Nodule Differentiation, Targeting Metabolic Profiles and Pathways via UHPLC-QTOF-ESI+-MS Analysis. *Diagnostics*. 2024; 14(21):2421. doi:org/10.3390/diagnostics14212421 *ISI Impact factor JCR<sub>2023</sub> – 3.0 (study in chapter 8)*.

## INTRODUCTION

Thyroid cancer is a global problem, with the number of cases constantly increasing, having a major impact on mortality, morbidity with an increasing incidence around the world. A special place in current research is represented by the discovery and study of tumor biomarkers that can diagnose and predict the evolution of malignancy. Numerous occupational and environmental exposures have been shown to contribute to an increase in the incidence of cancer, and explicitly affect and disrupt endocrine function. Recent studies have shown significant differences in the metabolites of benign and malignant thyroid nodules, but much less is known about their relationship with professional and environmental factors. Most commonly, tumor markers are evaluated by measuring their levels as biomolecules in tissues or in biofluids such as blood, urine, and saliva. Tumor biomarkers are non-specific (found in several types of cancer) or specific to a particular type of cancer, but what characterizes them conditionally is their presence only in case of malignant pathologies, being significantly different from normal tissues or from their profile in healthy people. In thyroid cancer, tumour biomarkers may show differences between batches of patients with benign and malignant pathology as a result of lifestyle, work in high-risk work environments or associations of occupational and non-occupational exposure such as circadian rhythm disorders. Consequently, the study of some thyroid cancer-specific-biomarker (oncometabolites) molecules, correlated with occupational exposure and circadian dysfunction, is an area of scientific and therapeutic interest.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Numerous literature data confirm that the most common malignancy of the endocrine system is thyroid cancer. However, there are still no reliable and specific biomarkers for the detection and staging of this disease. Biopsy is the current gold standard for the diagnosis of thyroid cancer, but the disadvantages of this technique are demonstrated by uncertain results and the inability to discriminate against various carcinomas, thus requiring additional surgical procedures to obtain a final diagnosis. Imaging techniques such as elastosonography can help distinguish nodules benign-malignant, but insufficient, and standardised methods are needed for more accurate diagnosis.

Currently, fine needle aspiration guides the management of patients with thyroid nodules. The use of this technique reduces unnecessary thyroid surgery, but the prevalence of non-diagnosis is still high.

Studies in recent decades show that tumors generally have a unique metabolic phenotype, the metabolome (the assembly of metabolites involved in metabolic pathways) is the „in the downstream signal of cellular activity. Metabolomics targets different classes of molecules with small molecular weights, the estimated number being over 5000, but varying depending on the type of cell or tissue. Metabolomics proposes

the global analysis of metabolites – molecules with small molecular masses (less than 100 Daltons) - which are involved in various metabolic pathways at the cellular and tissue level. Techniques applied in metabolomics include magnetic resonance spectroscopy (MRI) and mass spectrometry (MS) coupled with separation techniques such as gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). These techniques offer the chance to determine the metabolite profile and identify new biomarkers for early detection of thyroid cancer, reducing surgical risks. Most cancer cells use aerobic glycolysis (warburg effect) to produce energy necessary for cell proliferation and differentiation. Therefore, metabolomics is considered the „apogee of omice” technologies as it can evaluate cohorts of molecules that can differentiate a normal metabolism from tumor metabolism. This technology offers the chance to determine the metabolic profile, identify biomarkers for early detection, staging various thyroid pathologies, including thyroid cancer, reducing the risks of surgical procedures. Thus, metabolomics becomes a powerful tool that involves the systematic and concomitant measurement of several metabolites, including nutrients, drugs, signaling mediators and metabolic products/intermediates in the blood, urine, tissue extracts or other fluids. By default, oncometabolites and tumorigenesis determinants can be identified, opening up future opportunities to improve diagnosis, monitoring and treatment. Identification of oncometabolites is an important contribution to establishing the current diagnosis and protocols of thyroid cancer management.

## **PERSONAL CONTRIBUTIONS**

### **Study 1: Cumulative risk assessment for benign and malignant thyroid pathology based on the application of questionnaires and occupational exposure matrices**

**Purpose / Objectives:** The objectives of this study were to identify the professional and extraprofessional risk factors that could be involved in the etiology of malignant thyroid pathology, using questionnaires and the COR code (Classification of Occupations in Romania) adapted according to the international model (Standard Occupational Classification System SOC) in order to obtain a more complex professional exposure matrix that allows analyzing and comparing occupations in different fields of activity in terms of thyroid cancer risk.

**Material and methods:** The study was conducted on two groups of subjects, one with benign thyroid pathology, and the other with malignant thyroid pathology, selected at the time of presentation for diagnosis and/or treatment at the Surgery Clinic IV Cluj-Napoca in October 2022 and February 2023. We obtained a total of 61 patients diagnosed with various thyroid pathologies: who completed a series of questionnaires through direct interview or telephone interview. For each job mentioned in the questionnaire, a COR code corresponding to the respective occupation was allocated.

**Results:** Of the 61 patients with thyroid pathology included in the study, 24 were

diagnosed with various types of thyroid cancer and included in the TC group (thyroid cancer) papillary thyroid carcinoma (22), follicular carcinoma (1), medullary (1) and anaplastic (1), and 37 subjects were confirmed with benign thyroid pathologies, making up the BT group (benign thyroid), respectively nodular goiter (34), Hashimoto thyroiditis (2) and oncocytic follicular adenoma (1). All cases were histologically confirmed.

The average age of the patients was similar between the two groups. There was a small percentage of male representatives, 12.5% for TC, and 10.81% for BT, respectively. Most participants had an abnormal BMI, significant statistical data were recorded for the BT group, 20 patients were overweight compared to the TC group ( $p=0.0347$ ) and the obesity grade 2 category in the TC group ( $p=0.0231$ ). Regarding the a history of thyroid cancer, smoking habits and alcohol consumption, no statistically significant differences were obtained. The relationship between exposure to risk factors in the household environment was analysed, but no statistically significant differences between batches were observed. For the analysis of occupational risk factors, according to the classification of occupations in Romania (COR), were taken into account the 9 major occupational groups, subdivided later into major subgroups and additionally into minor groups. Of the TC group, only one person had no professional activity, vs. 3 people in the BT group, with an average age very close between the 2 batches (24 years for TC vs. 25.5 years for BT). In TC patients, there were no representatives of major groups 6 and 8, with BT being represented in all COR fields. In major groups 1, 4 and we had an equal number of TC and BT representatives. The biggest difference in the number of employees was recorded in groups 5, where the BT group was more represented (12 vs 7 employees) and 9, where we identified a higher number of subjects in the TC group (8 vs 6 employees). For major groups 2 and 3 there were minor differences, with an additional representative for each of the 2 groups in BT patients.

In the BT group we had a higher number of subjects who started their professional activity before the age of 18 (11 BT vs 5 TC). In the TC group, the majority (80%) had neuro-psycho-sensory overstrain over a period of more than 7 months by night shift, vs. 100% in the BT group.

**Conclusions:** The questionnaires used were aimed at analyzing occupational and general (non-occupational) risk factors, the results obtained were processed through complex exposure matrices to identify high-risk jobs or professions. Each occupation has been associated with a specific COR code to stratify individual cumulative risk and allow risk comparison between different areas of activity. High-risk professions with exposure to chemical agents of the detergents and disinfectants category, such as those in the field of cleaning and maintenance of buildings, office premises or industrial auxiliary premises, have been identified. Exposure to endocrine disruptors in the home environment did not significantly affect the risk of thyroid cancer. Professions have been identified where a large number of cases of thyroid cancer have been found, such as those of economist, accountant, administrative staff, but also

professions from various industrial sectors, such as textile workers, the footwear industry and the plastics industry.

## **Study 2. Serum metabolic profile and biomarkers of discrimination between thyroid nodules and papillary carcinoma**

**Purpose / Objectives:** The aim of this study was to establish the serum metabolic profile and to identify specific serum biomarkers of discrimination between thyroid nodules (TBs) and papillary carcinoma (PTCs). Thus, it was aimed to obtain a reliable image of the thyroid pathophysiology based on metabolism, which can elucidate modified molecular mechanisms, characteristic of these pathologies, involving specific classes of metabolites. The objectives of this study included: establishing the serum metabolic profile of patients diagnosed with PTC and BT compared to healthy (C) (1) witnesses, to identify potential differentiation biomarkers based on advanced metabolic analysis and multivariate and univariate statistics ANOVA (2), to highlight the affected metabolic pathways in each pathology (benign and malignant) (3).

**Material and methods:** The studied batches were 81 healthy subjects (group C) and 55 patients diagnosed with various benign and malignant thyroid pathologies were included in the study. The collection of serum samples took place between October 2022 and February 2023. The blood was harvested by venous puncture in sterile vacutainers without anticoagulant and the serum was kept at -80 C until analysis. The samples were labeled using confidential numeric codes. A volume of 0,8 mL of pure HPLC-quality methanol and acetonitrile (2:1 v/v) was added for each volume of 0,2 mL serum. In each case, the mixture was shaken in the vortex for 5 minutes to precipitate the proteins and was stored for 24 hours at -20°C. The supernatant collected after centrifugation at 12,500 rpm for 10 min (4°C) was filtered through nylon filters (0.25 µm) inserted into glass microfioles and placed in the autosampler of the ultra-high-performance liquid chromatograph (UHPLC) just before injection. The quality control samples (QC) were made in parallel: 10 µl were taken from each sample and added to 2 ml Eppendorf microtubes (Eppendorf Corporation, Germany), vortexed and divided into 0.2 ml per tube and pretreated using the same procedure to improve the data quality for metabolic profiling.

**Results:** According to the raw data obtained by UHPLC-TOF-ESI+-MS analytical procedures, 386 molecules were separated. Of these, 166 molecules classified into 10 classes of metabolites were identified.

The statistical analysis showed significant differences between C vs PTC+BT groups and less between PTC vs BT with a covariance of 32.1%. The top 15 molecules with VIP scores >1.5 and MDA scores were considered significant for group differentiation. Heatmap shows a number of 16 molecules with low levels in the PTC and BT groups compared to the controls and 9 molecules with elevated levels in PTC and BT (p threshold p<0.05). According to the data presented, 9 molecules had low values in the TC and BT groups compared to C. These were LysoPA(18:2), LysoPE(20:4) arachidonic

acid (C20:4), tetrahydrocortisol, taurocholic acid, LysoPC(20:3), inosinic acid, LysoPC(22:5), selenomethionine. Similarly, when comparing only the PTC groups with C, low levels for taurocholic acid, dihydrocortisol, S-adenosylmethionine, adenosine monophosphate, tetrahydrocortisol, LysoPE(20:4), LysoPC(20:3) and elevated LysoPC(16:0), homocysteine, thymine, 5-hydroxylysine, phenylalanine have been identified in the PTC group. Thus, 12 molecules had low levels in PTC vs BT and 13 molecules with elevated levels in TC ( $p < 0.05$ ). According to the biomarker analysis algorithm, ROC curves were obtained to evaluate the diagnostic capacity of a biomarker and the areas under the curves (AUC) were evaluated. The high values of AUC highlight which are the best biomarkers of differentiation between PTC vs C groups and PTC vs BT groups. According to the AUC values, the differentiation between PTC and group C was higher (AUC values above 0.966 for 17 molecules) compared to PTC vs BT differentiation, with values ranging from 0.730 to 0.644 in the selected molecule cohort. Based on the same Metaboanalyst software, the cohort of separate and identified molecules from all subjects underwent Pathway analysis taking into account the metabolic pathways affected by the targeted thyroid pathologies in this study. 10 Classes of molecules involved in specific metabolic pathways have been identified. For each class, anOVA univariate statistical analyses were performed, with the determination of PLSDA and VIP scores, RF analysis and thermal maps (Heatmap).

The results of the analysis of the metabolic pathway show a specific behaviour of different classes of metabolites, identifying either common metabolic structures of PTC and BT or specific changes for each pathological group compared to the control group C. **Conclusions:** The HPLC-QTOF-ESI+-MS-based metabolism can distinguish patients with thyroid pathology (cancer or benign) from healthy subjects. Using HPLC-QTOF-MS analysis as a precise method for the profiling of non-target metabolites coupled with advanced statistical models, available online, Metaboanalyst 5.0. platform that helps to apply various complementary analyses (from multivariate and univariate basic statistics, to biomarker analysis and path analysis). Specific biomarkers of differentiation between PTC and BT have been identified in each class of metabolites, overexpressed or under-expressed compared to the controls, involved in specific pathophysiology and metabolic pathways.

### **Study 3. Urinary metabolic profile and biomarkers of discrimination between thyroid nodules and thyroid papillary carcinoma**

**Purpose / Objectives:** The objectives of this study included: establishing the urinary metabolic profile of patients diagnosed with papillary carcinoma (group PTC), with benign pathology (group BT) compared to healthy witnesses (C) (1), identifying potential differentiation biomarkers based on metabolic analysis and multivariate and univariate statistics ANOVA (2), and highlighting the affected metabolic pathways in each pathology (benign and malignant) (3), comparing the data obtained from urine and serum samples, using the Venny algorithm and multivariate statistics, to identify common and specific biomarkers from these biofluids (4).

**Material and methods:** Patients and study design. Written informed consent was obtained from all subjects. A total of 20 healthy subjects (group C) and 60 patients diagnosed with various thyroid pathologies: mainly papillary carcinomas were included in the PTC group (n=30), and in the BT group (n= 30) patients with benign thyroid pathologies including mainly nodular goiter (GN) confirmed with clinical hypothyroidism (HT). The urine samples were collected in parallel with the blood samples between October 2022 and February 2023 from the Surgery Clinic IV Cluj-Napoca. The urine samples were collected from the first morning urine in sterile vials and stored, after adding 0.1% sodium azide to the freezer at -20°C. A volume of 0.8 ml of pure HPLC-quality methanol and acetonitrile (2:1 v/v) was added for each volume of 0.2 ml of urine. The mixture was stirred in the vortex for 5 minutes and stored for 24 hours at -20°C to stimulate protein precipitation. After centrifugation at 12,500 rpm for 10 minutes (4°C), the supernatant was collected, filtered through nylon filters (0.2 µm) and inserted into glass microfoles before injection into the LC-MS system (ultra-high performance liquid chromatograph). UHPLC quality control (QC) samples were taken in parallel, taking 10 µl from each sample.

**Results:** According to raw data obtained by UHPLC-TOF-ESI+-MS analytical procedures, 386 molecules were separated. Of these, 190 molecules were identified that were classified into 10 classes of metabolites.

According to the PLSDA chart, group C was significantly differentiated from PTC and BT groups, with a covariance of 33.3% and the PLSDA diagram shows a significant but less obvious differentiation between BT and PTC group, with a co-variance of 32.1%. VIP scores show the top 15 molecules that can explain the differentiation between the PTC, BT and C groups. The most significant differences were observed for guanosine, 6-hydroxymelatonin, homogenetic acid, homocysteine (with lower levels in the TC group, opposite to group B) and taurocholic acid (with higher levels in the TC group). These data were linked to complementary statistics. In order to highlight differences between the B-group and the TC, the Random Forest analysis graph is useful for an appropriate classification of biomarkers and the thermal map shows the relative increase or decrease in the levels of significant metabolites. Increased levels of hydroxytryptamine and N-acetyl tryptophan were observed for the TC group compared to group B. The thermal map illustrates 25 molecules with high (17) or low (8) levels in the TC group compared to group B ( $p < 0.05$ ).

Applying the Volcano plot Analysis, the Fold change values  $>0.5$  and  $\log_2(FC)$  showed a semi-quantitative assessment of the most significant differences between the TC and B batches. Significant decreases in dihydroxybutyric acid and nicotinuric were observed in the TC group, significant increases in glycerophosphocoline, serotonin, 12-ketodeoxycholic acid, leucine, taurocholic acid, LysoPE 22:0 and butenylcarnitin.

Biomarker analysis was applied to obtain ROC curves and AUC values (0-1) reflecting differentiation between TC and B groups and were compared with values

obtained from blood serum samples from similar groups. The AUC values for the first 10 molecules ranged from 0.730 to 0.650. According to these data in urine, mainly lipid molecules such as LisoPE (22:6) and LisoPE (22:0), mevalonic acid, dihydrocortizole, glycerophosphocoline, androsterone, 19-norandrosterone showed superior AUC values, while in the blood, LisoPA (18:2) and LisoPE(20:4), amino acid derivatives (taurine, acetylcysteine), acyl carnitine are better represented as biomarkers. The cohort of separate and identified molecules in all groups were subject to analysis of the affected metabolic pathways and the impact value ( $p$  threshold  $< 0.05$ ).

In the urine, significant impact has been identified for the metabolism of steroid hormones, thioamino acids, tryptophan, alanine, aspartate and glutamate. In general, the impact values were lower in urine compared to blood serum. Ten different classes of metabolites were involved in specific metabolic pathways and there were changes in carbohydrate metabolism and amino acids, butyrate derivatives and methionine and cysteine selenocomplexes, changes in nucleotide and nucleoside levels, bile acids with increased levels of some unsaturated free fatty acids in the two groups compared to the controls the involvement of a significant number of acylcarnitine and prostaglandins between the three groups B, TC and C, and

These data are consistent with the results obtained by Pathway Analysis, identifying either common metabolic pathways of TC and B, or specific changes for each pathological group, compared to the witnesses.

Given the molecules identified in urine ( $n=190$ ) and serum ( $n=166$ ), according to our previous data [139] the Venny 2.1 algorithm was applied and 90 common molecules were found as well as specific molecules in urine ( $n=100$ ) and serum ( $n=76$ ). **Conclusions:** Using non-target metabolomics based on UHPLC-QTOF-ESI+-MS technology, urine samples from patients diagnosed with thyroid carcinoma and benign nodular goiter were compared with healthy subjects. Specific presumptive differentiation biomarkers have been identified by multivariate and univariate statistics provided by the integrated Metaboanalyst 6.0 platform. The data obtained were compared with serum metabolic profiles obtained from the same patients. Ten different classes of metabolites were targeted and compared by semi-targeted analysis compared to the controls. Differentiated these classes of metabolites showed differences between the groups of subjects with papillary cancer and multinodular goiter. Metabolic analysis identified impaired metabolic pathways, namely the metabolism of polar molecules (glycolysis-specific metabolites, amino acids, and selenium complexes, purine and pyrimidine metabolites), but especially lipid metabolism (fatty acid biosynthesis, acylcarnitine and bile acids, steroid hormones), relevant for finding biomarkers related to thyroid carcinoma or benign nodules.

## GENERAL CONCLUSIONS

Thyroid pathology and thyroid cancer are a major global health problem caused by multiple factors, including occupational exposure and changes in the circadian profile. In this context, the doctoral thesis addresses a field of scientific and therapeutic interest, by studying new aspects, regarding the identification of–biomarker molecules that reflect disorders of specific metabolic pathways, highlighting specific oncometabolites of thyroid cancer, correlated with professional exposure. The three studies carried out starting from a complex experimental design, were able to lead through the results obtained to some general conclusions with scientific impact and in clinical practice.

1. There was an increased risk of thyroid cancer among staff who were professionally exposed to chemical pollutants, while exposure to endocrine disruptors in the household did not significantly affect the risk of thyroid cancer.
2. By using high performance chromatography-assisted metabolic technology coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS), the serum metabolic profile of patients in batches diagnosed with benign and malignant thyroid pathology was established, compared to healthy controls, specific differentiation biomarkers involved in specific metabolic pathways being targeted at carbohydrate, lipid and amino acid metabolism.
3. By the comparative use of non-targeted and semi-targeted metabolomics by blood and urine metabolites, with the evidence of biomarkers specific to the two pathologies, as well as the differential metabolic profile in blood and urine, respectively, there were revealed common or specific metabolites in each patient group, including the 10 distinct classes of molecules.
4. The results of the metabolic analyses confirmed the impairment and reprogramming of some metabolic pathways, especially in the case of thyroid cancer. Thus, the energy metabolism was affected (conditioned by thyroid hormones in benign pathology) and by metabolic reprogramming in case of thyroid cancer. In particular, carbohydrate metabolism has been affected by alterations in the glycolytic pathway and amino acid biosynthesis, in particular tryptophan and kynurenine, precursors and regulators of some neurotransmitters and cytokines. Changes in the precursors of nucleotide synthesis have also been identified.
5. In the case of urine samples were identified biomarkers common or specific to those highlighted in the blood, especially regarding the metabolism of polar molecules (glycolysis specific metabolites, amino acids, and selenium complexes, purine and pyrimidine metabolites), but also the biosynthesis of fatty acids, acylcarnitine and bile acids, steroid hormones, phospholipids and prostaglandins) relevant as tumor biomarkers compared to benign nodules.
6. Ten different classes of metabolites and metabolic pathways involved were identified by the semitarget analysis, among them affected metabolic pathways

involving the metabolism of polar molecules (purine and pyrimidine metabolites, amino acids, selenium complexes), but also lipid metabolism being involved the biosynthesis of bile acids, fatty acids, acylcarnitines, phospholipids, prostaglandins, steroid hormones that are more relevant in the differentiation of the two batches of thyroid pathologies.

7. Selenium levels in cysteine and methionine complexes were statistically significantly lower in the malignant pathology group and in the benign pathology group compared to the witnesses.

Highlighting these specific biomarkers in blood and urine, correlated with the occupational and non-occupational risk assessment matrix, can help identify and establish well-targeted prevention programs on professional environments.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF DOCTORAL RESEARCH**

The first study in Romania, aimed at using professional exposure matrices to highlight the risks associated with malignant and benign thyroid pathology, not being carried out so far. In the context of increased incidence of thyroid pathology the complex questionnaire carried out included non-modifiable risk factors as well as modifiable risk factors, with particular attention to occupational exposure. It is a first in the field of thyroid pathologies in our country and is among the few researches reported in the literature, especially due to the proposed correlations between the metabolic data, the professional exposure and the circadian profile of the investigated patients. Working protocols in metabolic analysis have been developed and optimized, previously validated by biofluid studies in patients with different types of cancer (colorectal, hepatic, breast or prostate), now applied to thyroid cancer. The studies carried out have enabled comparisons and identifications of common blood and urine biomarkers using updated biostatistics algorithms through the online platform Metaboanalyst 5.0. An innovative aspect is the study of urinary metabolism compared to serum metabolism in patients with thyroid pathologies, so far only one paper has been published in this regard. Selected metabolites and metabolic pathways affected in the two types of pathologies can be indicators and biomarkers of thyroid cancer prediction and can optimize current protocols for diagnosis and management of this pathology, helping to identify and implement targeted prevention programs, adapted to different professional environments.