
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**Biomarkeri metabolici în
relație cu sindromul de
burnout (disfuncții
circadiene) și patologii
asociate (cancer, boli
cardiovasculare, etc.):
studii retrospective și
prospective cu implicații în
medicina muncii**

Doctorand: **Andreea Petra LĂDARU (UNGUR)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Lucia Maria
PROCOPCIUC**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	2
1. Sindromul de burnout.....	4
1.1. Definiție.....	4
1.2. Mecanismul sindromului de burnout.....	6
1.3. Metode de evaluare.....	8
1.4. Factorii de risc pentru sindromul de burnout.....	8
1.5. Subtipurile de personalitate care pot influența fenomenul de burnout.....	10
1.6. Patologii asociate.....	10
1.6.1. Tulburările de comportament cu afecarea capacității de muncă.....	10
1.6.2. Tipuri de patologii asociate sindromului de burnout.....	11
1.7. Munca în schimbul de noapte și sindromul de burnout.....	16
1.8. Pandemia COVID 19 și sindromul de burnout.....	17
2. Programe de prevenție în medicina muncii pentru sindromul de burnout.....	18
2.1 Recomandări practice pentru prevenirea și managementul sindromului de burnout	20
3. Metabolomica: tehnologie analitică avansată aplicată în diagnosticul și monitorizarea patologiilor.....	21
3.1. Principii ale tehnologiei metabolomice.....	21
3.2. Utilizarea metabolomicii în diagnosticul și monitorizarea sindromului de burnout	22
3.2.1. MetaboAnalyst: o platformă integrată pentru analiza datelor de metabolomică.	23
3.3 Biomarkeri identificați în sindromul de burnout.....	25

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	31
4. Scop și obiective.....	32
5. Metodologie generală.....	32
5.1. Tehnologia UHPLC-QTOF-ESI+MS și procesarea datelor aplicate pentru studiul profilului metabolic.....	33
5.2. Analiza statistică.....	35
6. Studiul 1. Evaluarea riscului pentru sindromul de burnout pe baza aplicării de chestionare.....	37
6.1. Introducere.....	37
6.2. Obiective.....	37
6.3. Material și metodă.....	38
6.3.1. Analiza statistică.....	39
6.4. Rezultate.....	40
6.4.1 Evidența participanților.....	40
6.4.1 Status fumător.....	41
6.4.2. Consumul de alcool.....	42
6.4.3 Calitatea somnului.....	43
6.4.4 Activitatea în ture.....	44
6.4.4.1.Preferința pentru tura de noapte.....	44
6.4.5. Probleme de sănătate asociate cu tura de noapte.....	46
6.4.6. Accidentele la locul de muncă.....	49
6.4.7. Durata serviciului.....	49
6.4.8. Comorbidități.....	51
6.4.9. Intenția de schimbare a locului de muncă.....	52

6.5. Discuții.....	57
6.6. Concluzii.....	60
7. Studiul 2. Profilul metabolic seric în sindromul de burnout exprimat prin criteriile DP, EE și PA.....	61
7.1. Introducere.....	61
7.2. Obiective.....	62
7.3. Material și metodă.....	62
7.3.1. Pacienți și designul studiului.....	62
7.3.2. Clasificarea probelor în funcție de scorurile de burnout.....	63
7.3.3. Pregătirea probelor.....	64
7.3.4. Analiza UHPLC-QTOF-ESI+MS netargetată și procesarea statistică a datelor.....	64
7.4. Rezultate.....	65
7.4.1. Separarea și identificarea moleculelor prin analiza UHPLC-QTOF-ESI+MS și procesare statistică.....	65
7.4.2. Analiza statistică multivariată utilizată pentru a diferenția profilurile metabolice ale lucrătorilor în ture de noapte față de cei în ture de zi.....	68
7.4.3. Analiza biomarkerilor și a căilor metabolice ale metaboliților la lucrătorii în ture de noapte comparativ cu cei în ture de zi.....	70
7.4.4. Analiza metabolomică netargetată luând în considerare variabilele EE, DP, PA72	
7.4.5. Statistica multivariată pentru moleculele implicate în nivelurile de burnout, la subiecții care lucrează în tura de noapte.	75
7.4.6. Evaluarea semitargetată pentru 5 clase de molecule.....	76
7.5. Discuții.....	79
7.6. Concluzii.....	82

8. Studiul 3. Profilul metabolic urinar în sindromul de burnout exprimat prin criteriile DP, EE și PA.....	84
8.1. Introducere.....	84
8.2. Obiective.....	84
8.3. Material și metodă.....	84
8.3.1. Subiecții și concepția studiului.....	84
8.3.2. Pregătirea probelor.....	86
8.3.3. Analiza UHPLC-QTOF-ESI+MS și procesarea statistică a datelor.....	86
8.3.4 Analiza statistică.....	86
8.4. Rezultate.....	88
8.4.1. Distribuția probelor de urină în funcție de scorurile aferente burnout-ului.....	88
8.4.2. Analiza netargetată a profilurilor metabolomice pentru diferențiere între subiecții cu activitate nocturnă și diurnă.....	89
8.4.3. Analiza biomarkerilor și a căilor metabolice la subiecții care lucrează în ture de noapte comparativ cu cei din ture de zi.....	94
8.4.4 Analiza metabolomică netargetată în funcție de criteriile de burnout: DP, EE și PA (toți participanții)	96
8.4.5. Analiza metabolomică semi-targetată în funcție de criteriile de burnout DP și EE, pentru trei clase de molecule.....	100
8.4.6. Analiza ANOVA univariată aplicată markerilor metabolici asociați criteriilor DP, EE și PA, în funcție de tipul de muncă (zi vs noapte)	102
8.4.7. Analiza comparativă a metaboliților separați și identificați în urină vs serul sanguin.....	104
8.5. Discuții.....	105
8.6. Concluzii.....	106
9. Discuții generale.....	108
10. Concluzii generale.....	110

11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale.....	113
REFERINȚE.....	114

Cuvinte cheie: sindrom de burnout, personal medical, epuizare emoțională, depersonalizare, stres ocupațional, biomarkeri

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Ungur AP**, Bârsan M, Socaciu AI, Râjnoveanu AG, Ionuț R, Goia L, Procopciuc LM. A Narrative Review of Burnout Syndrome in Medical Personnel. *Diagnostics* (Basel). 2024 Sep 6;14(17):1971. doi: 10.3390/diagnostics14171971. PMID: 39272755; PMCID: PMC11393962.
2. **Ungur AP**, Socaciu AI, Barsan M, Rajnoveanu AG, Ionut R, Socaciu C, Procopciuc LM. Urine Metabolomic Patterns to Discriminate the Burnout Levels and Night-Shift-Related Stress in Healthcare Professionals. *Metabolites*. 2025 Apr 14;15(4):273. doi: 10.3390/metabo15040273. PMID: 40278402; PMCID: PMC12029983.
3. **Ungur AP**, Socaciu AI, Barsan M, Rajnoveanu AG, Ionut R, Socaciu C, Procopciuc LM. Blood Metabolic Biomarkers of Occupational Stress in Healthcare Professionals: Discriminating Burnout Levels and the Impact of Night Shift Work. *Clocks Sleep*. 2025 Jul 14;7(3):36. doi: 10.3390/clockssleep7030036. PMID: 40700258.

INTRODUCERE

Sindromul de burnout în rândul angajaților a fost corelat cu o serie de factori de risc majori, implicați în etiopatogeneza bolilor cardiovasculare, a tulburărilor psihiatrice, precum și a anumitor forme de patologie tumorală.

Prezenta teză de doctorat își propune investigarea sindromului de burnout în cadrul personalului medical, printr-o abordare integrativă care ia în considerare particularitățile sistemului medical românesc, factorii determinanți implicați în declanșarea și menținerea sindromului, precum și mecanismele fiziopatologice prin care aceștia acționează.

Designul metodologic al studiului a inclus aplicarea unor instrumente psihometrice validate internațional, sub forma unor chestionare standardizate, precum și recoltarea de probe biologice de la un eșantion selectat de subiecți, aparținând diverselor specialități medicale. Probele biologice au fost analizate utilizând metode de înaltă rezoluție, specifice metabolomicii moderne, cu aplicarea tehnicilor de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu spectrometrie de masă.

Rezultatele preliminare au permis identificarea unor biomarkeri moleculari cu potențial predictiv pentru niveluri ridicate de burnout, evidențiindu-se variații semnificative ale acestora în funcție de gradul de severitate al sindromului, fapt ce susține ipoteza unei legături bidirecționale între stresul ocupațional cronic și modificările metabolice sistemice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sindromul de burnout este recunoscut ca o problemă majoră în medicina ocupațională la nivel global, conducând la oboseală generalizată, epuizare profesională și insatisfacție la locul de muncă. Această stare de stres cronic se caracterizează prin epuizare mentală, oboseală fizică, detașare față de activitatea profesională, reducerea competenței, pierderea energiei, iritabilitate crescută, tulburări de somn și dificultăți de concentrare. Sindromul poate afecta indivizi din toate profesiile și este adesea asociat cu depresie și anxietate.) Sindromul de burnout la personalul medical implică atât aspecte legate de individualitatea fiecăruia, precum și factori strict conectați cu locul de muncă; un nivel înalt de burnout, implică mai întâi epuizare emoțională, apoi depersonalizare și culminează cu un nivel scăzut al stimei de sine.

Evaluarea sindromului de burnout se face cu ajutorul chestionarelor pentru evaluarea nivelului de burnout, care au fost elaborate uni sau multidimensional pentru unul sau mai multe domenii de activitate și pentru diferite locuri de muncă. Prevenția burnout-ului ar putea fi realizată prin cunoașterea și evitarea factorilor de risc pentru acest sindrom. Studiile arată ca factorii de risc sunt evitabili și nonevitabili, ocupaționali și non-ocupaționali.

Burnout-ul cronic se poate manifesta prin afectare cognitivă a memoriei și perturbarea atenției. Patologiile asociate sindromului de burnout sunt în strânsă legătură cu afectarea activităților cotidiene, în special a somnului care poate fi principalul generator al bolilor cardiovasculare, digestive, sindromului metabolic și poate merge pâna la afecțiuni tumorale, psihiatrice.

Personalul care lucrează în ture alternante se confruntă mai frecvent cu insomnie, perioade de somn de calitate nesatisfăcătoare și somnolență diurnă excesivă.

Aspecte care se reflectă asupra stării de sănătate, atât fizică cât și mentală a individului. S-a raportat o prevalență crescută a obezității, diabetului zaharat de tip 2, a bolilor din sfera cardiovasculară, inclusiv hipertensiunea arterială, și din sfera gastrointestinală. Aceste persoane pot suferi de depresie și anxietate. Tulburările de somn sunt de asemenea cauza tulburărilor de atenție, concentrare, dificultate de a procesa și executa diverse cerințe.

Printre factorii ocupaționali de risc menționați anterior, volumul de muncă, experiența profesională, activitatea în tura de noapte are rolul majoritar în generarea patologiilor corelate cu deprivarea de somn: boli cardiovasculare, cancer, sindrom metabolic și patologii psihiatrice.

Lucrătorii din domeniul sănătății au raportat niveluri ridicate și persistente de stres, traumă și anxietate în timpul pandemiei de COVID-19, situație determinată, în parte, de incertitudinea legată de evoluția pandemiei și de durata în care aceștia ar fi fost nevoiți să facă față unui volum de muncă copleșitor.

Având în vedere dimensiunea și complexitatea impactului sindromului de burnout asupra sănătății fizice și mentale, precum și asupra performanței profesionale, se impune necesitatea elaborării și implementării unor strategii coerente de prevenție și intervenție, adaptate atât nivelului individual, cât și celui organizațional.

Aceste măsuri ar trebui să fie fundamentate pe dovezi științifice și să integreze abordări multidisciplinare, vizând reducerea factorilor de risc ocupaționali, promovarea rezilienței psihologice și consolidarea unui climat organizațional favorabil sănătății mintale a angajaților.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Evaluarea riscului pentru sindromul de burnout pe baza aplicării de chestionare

Scop / Obiective: evaluarea prevalenței sindromului de epuizare profesională pe baza celor trei dimensiuni: depersonalizare, epuizare emoțională și realizare personală, în rândul personalului medical angajat într-un spital din România

Material și metode: Studiul a fost realizat pe un lot de subiecți angajați ai Spitalului Orășenesc „George Trifon” din Năsăud, în anul 2023. Personalul medical și personalul administrativ, a fost inclus în studiu, rezultând un număr total de 193 de participanți.

Toți participanții au semnat un consimțământ informat iar datele au fost colectate utilizând două seturi de chestionare.

Rezultate: Epuizarea emoțională a prezentat o corelație pozitivă moderată cu depersonalizarea ($\rho \approx 0.38$, $p < 0.001$), ceea ce indică faptul că, pe măsură ce nivelul de epuizare crește, angajații tind să manifeste și un grad mai ridicat de detașare față de pacienți și sarcinile profesionale.

În același timp, EE a fost negativ corelată cu realizarea personală ($\rho \approx -0.39$, $p < 0.001$), sugerând că o intensificare a epuizării emoționale este asociată cu o scădere a percepției proprii eficiențe și a satisfacției profesionale. De asemenea, DP s-a corelat negativ cu PA ($\rho \approx -0.32$, $p < 0.001$), ceea ce sugerează că, pe măsură ce angajații devin mai depersonalizați, scade și sentimentul de realizare profesională. Un număr de 192 de participanți au completat și un chestionar referitor la experiențele personale și percepțiile avute în timpul pandemiei de COVID-19, care are 6 categorii principale. Fiecare dintre aceste categorii a fost analizată în vederea identificării unor potențiale corelații între acestea și scorurile corespunzătoare celor trei dimensiuni ale sindromului de burnout. Pe baza coeficienților de corelație Spearman, s-au identificat mai multe asocieri semnificative statistic între dimensiunile chestionarului Pandemic Experiences and Perceptions Survey și scorurile de burnout Maslach.

Concluzii: În cadrul studiului nostru, am observat un nivel crescut de burnout în rândul participanților care au prezentat scoruri ridicate la dimensiunea epuizării emoționale (EE – emotional exhaustion), aceasta fiind prima componentă afectată de volumul mare de muncă, munca în ture și lipsa somnului.

Factorii de risc care au influențat semnificativ nivelul de burnout au fost: tipul ocupației, experiența profesională, sexul și privarea de somn. În mod particular, personalul medical – mai ales cel din secțiile solicitante precum ATI, urgență sau chirurgie – a prezentat niveluri semnificativ mai ridicate ale sindromului de burnout, în comparație cu personalul administrativ.

Studiu 2. Profilul metabolic seric în sindromul de burnout exprimat prin criteriile DP, EE și PA

Scop / Obiective: Studiul de față își propune să ofere perspective noi privind biomarkerii burnout-ului în probele de sânge colectate de la subiecți și să le compare cu datele metabolice cunoscute din literatură. Abordările nespecifice și semi-direcționate au permis o înțelegere mai amplă a biomarkerilor comuni și specifici implicați în căile metabolice asociate burnout-ului.

Material și metode: În perioada septembrie-octombrie 2023, un total de 97 de cadre medicale (medici și asistente) au fost evaluate folosind chestionarul Maslach Burnout Inventory (MBI), versiunea pentru personal medical (MBI-HSS (MP)). Nivelurile de burnout au fost determinate pe baza celor trei dimensiuni: Epuizare Emoțională (EE), Depersonalizare (DP) și Realizare Personală (PA). Răspunsurile au fost colectate prin

interviuri directe, iar participanții au fost împărțiți în două grupuri: burnout ridicat (n=21, scoruri mari și medii) și burnout scăzut (n=76). Personalul medical a fost clasificat suplimentar în funcție de condițiile de muncă (lucru de zi/noapte) și conform scorurilor MBI pentru cele trei dimensiuni. Probele de sânge au fost colectate prin venopuncție în vacutainere sterile fără anticoagulant, dimineața înainte de micul dejun, în aceeași zi cu interviul. Serul a fost păstrat la -80°C până la analiză și etichetat cu coduri numerice confidențiale. Profilul metabolic a fost realizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă cu ionizare pozitivă electrospray (UHPLC-QTOF-ESI+-MS).

Rezultate: În cadrul studiului s-au identificat 99 de molecule serice utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă cu timp de zbor și ionizare electrospray în mod pozitiv (HPLC-QTOF-ESI+MS). Identificarea acestor metaboliți s-a bazat pe valorile experimentale m/z ale ionilor precursor [M+1], care au fost comparate cu valorile teoretice medii disponibile în baza de date internațională Human Metabolome Database (HMDB). Analiza metabolomică netargetată a fost utilizată pentru a diferenția profilurile metabolice ale lucrătorilor în ture de noapte față de cei în ture de zi, pe baza datelor obținute prin UHPLC-QTOF-ESI+MS. Metaboliții identificați au fost clasificați în cinci categorii moleculare, pentru a evalua diferențele semnificative dintre cele două grupuri de subiecți, s-au aplicat metode statistice multivariate, inclusiv Analiza Discriminantă PLSDA, scorurile VIP și RF și harta Heatmap.

Concluzii: În cadrul acestui studiu, prin aplicarea tehnologiilor avansate de metabolomică, au fost identificate patru căi metabolice majore implicate în manifestarea burnoutului, evidențiind astfel o componentă biologică semnificativă în etiopatogenia acestui sindrom. Modificările metabolice identificate au implicat: metabolismul lipidic, în special sinteza hormonilor steroizi indicând o activare a axei HPA și un dezechilibru endocrin asociat stresului cronic; metabolismul aminoacizilor și catecolaminelor, în special o reducere a noradrenalinei, neurotransmițător esențial în reglarea răspunsului la stres; metabolismul energetic mitocondrial, cu accent pe adaptările celulare la cerințele energetice crescute în condiții de stres prelungit; activarea lipolizei, reflectată prin creșterea nivelurilor de acizi grași liberi și sinteza crescută a fosfolipidelor, sugerând un mecanism compensator de generare a energiei în contextul stresului metabolic. Aceste căi metabolice oferă o bază solidă pentru dezvoltarea unor strategii de prevenție și intervenție în managementul burnoutului, în special în rândul angajaților expuși la munca în ture de noapte.

Studiul 3. Profilul metabolic urinar în sindromul de burnout exprimat prin criteriile DP, EE și PA

Scop / Obiective: Studiul își propune să ofere date noi privind biomarkerii burnout-ului în probele de urină colectate de la aceiași subiecți și să le compare cu datele

metabolomice obținute anterior din sânge. Abordările nespecifice și semi-direcționate au permis o înțelegere mai amplă a biomarkerilor comuni și specifici implicați în căile metabolice asociate burnout-ului, evidențiind relevanța urinei ca biofluid în evaluarea precisă a nivelului de epuizare profesională.

Material și metode: Eșantionul investigat a fost format din 64 de cadre medicale (medici și asistenți medicali) angajate într-o unitate spitalicească. Recoltarea probelor biologice a fost efectuată de la toți subiecții. În momentul recoltării probelor de sânge, participanții au primit recipiente sterile și instrucțiuni standardizate pentru colectarea probelor de urină. Totuși, o parte dintre aceștia nu au returnat probele urinare, ceea ce a condus la o discrepanță între numărul de probe de sânge ($n=97$) și cel de probe de urină ($n=64$). Probele de urină au fost colectate în dimineața zilei următoare interviului, în jurul orei 06:00, înainte de micul dejun, în recipiente sterile, conform instrucțiunilor detaliate furnizate anterior participanților. Pentru conservare, în fiecare probă a fost adăugat azidă de sodiu (Na-azidă) 0,1%, iar ulterior probele au fost stocate la -80°C până la momentul analizelor. Fiecare probă a fost etichetată cu un cod numeric confidențial, pentru a asigura anonimatul participanților. Prin analiza probelor de urină utilizând UHPLC-QTOF-ESI*MS, au fost separate aproximativ 850 de molecule. Datele obținute au fost procesate cu ajutorul software-ului Data Analysis 4.2. În primă etapă, din cromatograma totală a ionilor (TIC) a fost generată și cromatograma de vârf de bază (BPC), folosind algoritmi specifici. Ulterior, s-a construit o matrice complexă prin aplicarea algoritmului Find Molecular Features (FMF), care a inclus toate probele, valori m/z ce reprezintă ionii precursori $[M+1]$, timpul de retenție, intensitatea semnalului MS, conform metodologiei utilizate anterior pentru serul sanguin. Biomarkerii potențiali indicați ca fiind asociați cu dezechilibre metabolice induse de burnout au fost selectați fie pe baza literaturii de specialitate, fie prin filtrare statistică din analiza netargetată. Abordarea semi-targetată a fost concentrată pe trei clase de molecule de interes: compuși polari (inclusiv neurotransmițători), steroide și acilcarnitine, aceste categorii fiind identificate ca relevante în analiza netargetată. Pentru a diferenția subiecții în funcție de tipul de tură (zi/noapte) și de nivelul de burnout (High/Low) pentru cele trei dimensiuni (DP, EE, PA), s-a aplicat analiza ANOVA univariată (One-Way ANOVA), iar pentru comparațiile post-hoc s-a utilizat testul Fisher LSD (Least Significant Difference). În final, s-a utilizat algoritmul Venny 2.1 (<https://csbg.cnb.csic.es>) pentru a compara profilul metabolomic urinar cu cel sanguin, în vederea identificării de molecule comune sau specifice, cu potențial rol de biomarkeri de diferențiere.

Rezultate: Pe baza datelor obținute în urma analizei UHPLC-TOF-ESI*MS, au fost selectați și identificați 79 de metaboliți, grupați în cinci clase moleculare distincte. Moleculele au fost separate utilizând tehnica HPLC-QTOF-ESI*MS și identificate pe baza valorilor ionului precursor $[M+1]$. Pentru evaluarea diferențelor dintre cele două grupuri de participanți, respectiv Grupul 0 (personal medical în ture de zi) și Grupul 1 (personal medical în ture de noapte) au fost aplicate metodele statistice PLS-DA, cu

scoruri VIP, analiza RF și hărți Heatmap. Rezultatele acestor analize evidențiază diferențe semnificative în profilurile metabolice urinare între cele două categorii profesionale, sugerând o amprentă metabolică distinctă, asociată activității în ture de noapte. Pe baza datelor obținute, s-au identificat o serie de metaboliți urinari cu niveluri semnificativ mai ridicate în grupul personalului care lucrează în ture de noapte, comparativ cu cel al turelor de zi. Printre aceștia se numără: melatonina, acidul fenilactic, retinil-linoleatul, leucil-treonina, cortizonul și androstenedionul. În schimb, nivelurile de noradrenalină au fost semnificativ diminuate în același grup, ceea ce poate reflecta un răspuns neuroendocrin specific la stresul indus de activitatea nocturnă și perturbarea ritmului circadian.

Intregul set de 79 de metaboliți identificați a fost supus concomitent unei analize a căilor metabolice (Pathway Enrichment), luând în considerare valorile p și scorurile de cu valori de până la 3,5. Pornind de la cohorta de metaboliți selectați pentru analiza statistică, au fost identificate trei clase moleculare distincte - metaboliți polari, acilcarnitine și metaboliți steroidieni - considerând impactul acestora în căile metabolice relevante pentru burnout. Pentru fiecare dintre aceste clase, au fost aplicate analize statistice specifice în platforma MetaboAnalyst 5.0, utilizând matrici aliniate și luând în considerare criteriile de burnout DP și EE. Astfel au fost identificați biomarkeri metabolici capabili să distingă între grupul 0 (muncă de zi) și grupul 1 (muncă de noapte). Pentru o abordare integrativă a datelor, a fost aplicată analiza statistică ANOVA univariată (One-way ANOVA), cu scopul de a compara simultan nivelurile ridicate (H) și nivelurile scăzute (L) de burnout, raportat la toate cele trei criterii definite de chestionarul MBI-HSS: Depersonalizare (DP), Epuizare Emoțională (EE) și Realizare Personală (PA). Această analiză a permis evidențierea diferențelor metabolice relevante între subiecții care desfășoară muncă de zi și cei care lucrează în ture de noapte, în funcție de intensitatea sindromului de burnout.

Concluzii: Trei căi metabolice principale au fost identificate ca esențiale pentru diagnosticarea burnout-ului: metabolismul lipidelor, implicând în special hormoni steroizi (precum cortisolul, cortizonul și metaboliții androsteronului); metabolismul energetic, cu acilcarnitinele pe termen lung care acționează ca transportatori ai acizilor grași liberi, ajutând la reglarea nivelurilor de burnout; și metabolismul catecolaminelor (neurotransmițători derivați din tirozină, inclusiv dopamina, adrenalina și noradrenalina), precum și metabolismul triptofanului (metaboliți ai serotoninei și melatoninei, aspartat, arginină și valină).

CONCLUZII GENERALE

Analiza integrată a celor trei studii evidențiază faptul că sindromul de burnout, în special în rândul profesioniștilor din domeniul sănătății expuși la stres cronic, munca în

ture și privarea de somn, este asociat cu modificări metabolice complexe și specifice. Datele obținute susțin existența unui substrat biologic semnificativ, care poate fi investigat prin tehnici avansate de metabolomică aplicate atât pe probe sanguine, cât și urinare.

S-au efectuat trei studii, pornind de la un design experimental complex, de la întocmirea loturilor de pacienți, la stabilirea criteriilor de includere/excludere și a protocoalelor de lucru pentru fiecare studiu. Astfel:

- S-au identificat locuri de muncă cu risc crescut, prin întocmirea unor chestionare complexe pentru evaluarea nivelului de burnout la personalul medical cu activitate profesională în tura de noapte;
- Prin utilizarea tehnologiei metabolomice asistate de cromatografia de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (UHPLC-MS) și biostatistică multivariată și univariată s-a stabilit profilul metabolic seric al pacienților din loturile delimitate conform condițiilor stabilite. Din cohorta de molecule selectate pentru analiza statistică au fost identificate cinci clase de molecule, implicate în metabolismul glucidic, lipidic și al turnoverului aminoacizilor.
- S-a utilizat comparativ metabolomica netargetată și semi-targetată pe categorii de metaboliți din sânge și urină, cu evidențierea biomarkerilor specifici pentru sindromul de burnout precum și a profilului metabolic diferențiat din sânge și respectiv urină (Studiul 2 și 3).

Obiectivele acestor studii au fost indeplinite, iar rezultatele obținute au evidențiat aspecte de interes științific și cu relevanță clinică și preclinică. Astfel:

1. Prin prelucrarea datelor obținute prin chestionare au fost identificate locurile de muncă sau profesiile cu risc crescut de burnout din domeniul medical.
2. Metodologia aplicată pentru analiza metabolomică a fost completată de analiza biostatistică multivariată și univariată, bazată pe platforma internațională, specializată în Metabolomică, și anume Metaboanalyst 5.0. platformă care a fost foarte utilă pentru a evidenția biomarkerii de diferențiere cu relevanță statistică și căile metabolice afectate.
3. Rezultatele analizelor metabolomice au confirmat afectarea și reprogramarea unor căi metabolice majore implicate în manifestarea burnoutului, în acord și cu datele de literatură recente, astfel, s-a evidențiat afectarea metabolismului energetic. A fost afectat îndeosebi metabolismul glucidic, prin alterarea căii glicolitice și a biosintezei aminoacizilor, îndeosebi a triptofanului și kinureninei, precursori și reglatori ai unor neurotransmitători și citokine. De asemenea, au fost identificate modificări ale precursorilor din sinteza nucleotidelor.
4. 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 pentru sindromul de burnout.

5. S-au identificat prin analiza semitargetată clase diferite de metaboliți și căile metabolice implicate, 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 ca biomarkeri.

Un aspect comun identificat este perturbarea metabolismului lipidic și steroidogenic, manifestată prin dezechilibre în nivelele hormonilor de stres (cortizol, DHAS, androstenedion, estrogeni) și modificări în sinteza fosfolipidelor și lizofosfolipidelor. Aceste dezechilibre indică o activare a axei hipotalamo-hipofizo-adrenale (HPA) și o adaptare metabolică la stresul prelungit.

De asemenea, studiile au evidențiat alterări ale metabolismului aminoacizilor esențiali și non-esențiali, precum și ale metabolismului neurotransmițătorilor implicați în reglarea stării emoționale și a răspunsului la stres, cum ar fi triptofanul, serotonina, melatonina, catecolaminele (noradrenalină, dopamină, adrenalină). Rolul carnitinelor acilate, ca mediatori ai transportului acizilor grași și ai metabolismului energetic mitocondrial, apare ca un alt element central în adaptarea celulară la stresul ocupațional.

Profilul metabolic a confirmat că urina reprezintă o matrice biologică valoroasă și neinvazivă pentru monitorizarea modificărilor metabolice asociate burnout-ului, având avantajul de a reflecta dinamica turnover-ului metabolic și dezechilibrele circadiene. Aceasta deschide perspective noi în dezvoltarea unor biomarkeri clinici utili pentru diagnostic și evaluarea progresului intervențiilor terapeutice.

Limitările identificate, cum ar fi dimensiunea eșantioanelor, dezechilibrul de gen și factori confuzionali necontrolați, indică necesitatea unor studii prospective, pe cohorte mai largi și diversificate, care să permită validarea acestor biomarkeri și înțelegerea mai profundă a mecanismelor biochimice implicate în burnout.

În final, integrarea acestor rezultate în politicile de sănătate ocupațională și implementarea unor măsuri preventive și strategii adaptate angajaților, în special celor care lucrează în ture de noapte, reprezintă pași esențiali pentru reducerea impactului burnout-ului și promovarea sănătății mintale la locul de muncă.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Unul dintre elementele definitorii ale originalității acestui studiu constă în aplicarea metabolomicii în contextul burnout-ului ocupațional: spre deosebire de majoritatea studiilor care se concentrează doar pe aspectele psihometrice sau clinice, această cercetare explorează substratul biologic al burnout-ului, oferind o perspectivă multidisciplinară ce combină biomarkerii metabolici cu măsurători psihologice validate.

Analiza comparativă între lucrul în ture de zi și ture de noapte: studierea diferențelor metabolice asociate cu munca în ture de noapte, un factor de stres major și puțin explorat în profunzime în literatura de specialitate, contribuie la înțelegerea impactului disfuncțiilor circadiene asupra sănătății mintale și metabolice a personalului medical.

Utilizarea urinei ca fluid biologic pentru detectarea biomarkerilor burnout-ului: acest demers reprezintă o noutate metodologică importantă, oferind o alternativă neinvazivă și accesibilă pentru monitorizarea stării fiziologice a angajaților, cu potențial în aplicarea clinică și în supravegherea sănătății ocupaționale.

Identificarea unor căi metabolice specifice implicate în burnout: evidențierea rolului metabolismului lipidic, aminoacizilor, neurotransmițătorilor și sistemului energetic mitocondrial oferă o bază științifică solidă pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice și preventive personalizate, care pot fi aplicate în contexte profesionale cu risc crescut.

Abordarea integrativă și interdisciplinară: combinarea datelor metabolice cu scorurile standardizate de burnout (MBI) și analiza factorilor de risc ocupaționali demonstrează potențialul acestei metode în elaborarea unor instrumente diagnostice obiective și a unor intervenții țintite.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

**Metabolic Biomarkers in
Relation to Burnout
Syndrome (Circadian
Dysfunctions) and
Associated Pathologies
(Cancer, Cardiovascular
Diseases, etc.):
Retrospective and
Prospective Studies with
Implications in
Occupational Medicine**

Ph D: **Andreea Petra LĂDARU (UNGUR)**

Ph D supervisor: **Prof. Dr. Lucia Maria PROCOPCIUC**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

THE CONTENTS OF THE DOCTORAL THESIS

INTRODUCTION.....	1
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	2
1. The burnout syndrome.....	4
1.1. Definition.....	4
1.2. The mechanism of the burnout syndrome.....	6
1.3. Evaluation methods.....	8
1.4. The risk factors for the burnout syndrome.....	8
1.5. Personality subtypes that can influence the burnout syndrome.....	10
1.6. Associated pathologies.....	10
1.6.1. Behavioral disorders affecting work capacity.....	10
1.6.2. Types of pathologies associated to the burnout syndrome.....	11
1.7. The night shift and the burnout syndrome.	16
1.8. COVID 19 Pandemics and the burnout syndrome.....	17
2.Occupational medicine prevention programmes for burnout.....	18
2.1 Practical recommendations for the prevention and management of the burnout syndrome.....	20
3. Metabolomics: advanced analytical technology applied in the diagnosis and monitoring of pathologies.....	21
3.1. Principles of the metabolomics technology.....	21
3.2. The use of metabolomics in the diagnosis and monitoring of burnout syndrome	22
3.2.1. MetaboAnalyst: an integrated platform for metabolomics data analysis.....	23

3.3 Biomarkers identified in the burnout syndrome.....	25
PERSONAL CONTRIBUTION.....	31
4. Objectives.....	32
5. General methodology.....	32
5.1. UHPLC-QTOF-ESI+MS technology and data processing applied to metabolic profiling studies.....	33
5.2. Statistical analysis.....	35
6.Study 1. Risk assessment for burnout syndrome based on questionnaire application.....	37
6.1. Introduction.....	37
6.2. Objectives.....	37
6.3. Material and method	38
6.3.1. Statistical analisys.....	39
6.4. Results.....	40
6.4.1 Participant records.....	40
6.4.1 Smoking status.....	41
6.4.2. Alcohol consumption.....	42
6.4.3 Sleep quality.....	43
6.4.4 Shift activity.....	44
6.4.4.1.Preference for the night shift.....	44
6.4.5. Health problems associated to the night shift.....	46
6.4.6. Accidents at work.....	49
6.4.7. Hours of work.....	49
6.4.8. Comorbidities.....	51

6.4.9. Intention to change the job.....	52
6.5. Discussions.....	57
6.6. Conclusions.....	60
7. Study 2. Serum metabolic profile in burnout syndrome expressed by DP, EE and PA criteria.....	61
7.1. Introduction.....	61
7.2. Objectives.....	62
7.3. Material and method.....	62
7.3.1. Patients and study design.....	62
7.3.2. Classification of samples according to the burnout scores.....	63
7.3.3. Samples preparation.....	64
7.3.4. Untargeted UHPLC-QTOF-ESI+MS analysis and statistical data processing.....	64
7.4. Results.....	65
7.4.1. Separation and identification of molecules by UHPLC-QTOF-ESI+MS analysis and statistical processing.....	65
7.4.2. Multivariate statistical analysis used to differentiate metabolic profiles of night shift workers versus day shift workers.....	68
7.4.3. Analysis of biomarkers and metabolic pathways of metabolites in night shift workers compared to day shift workers.....	70
7.4.4. Untargeted metabolomic analysis considering EE, DP, PA variables.....	72
7.4.5. Multivariate statistics for molecules involved in burnout levels in subjects working the night shift.	75
7.4.6 Semi-targeted evaluation for 5 classes of molecules.....	76
7.5. Discussions.....	79
7.6. Conclusions.....	82

8. Study 3. Urinary metabolic profile in burnout syndrome expressed by DP, EE and PA criteria.....	84
8.1. Introduction.....	84
8.2. Objectives.....	84
8.3. Material and method.....	84
8.3.1. Subjects and study design.....	84
8.3.2. Samples preparation.....	86
8.3.3. UHPLC-QTOF-ESI+MS analysis and statistical data processing.....	86
8.3.4 Statistical analysis.....	86
8.4. Results.....	88
8.4.1. Distribution of urine samples according to burnout scores.....	88
8.4.2. Untargeted analysis of metabolomic profiles for differentiation between nocturnal and diurnal subjects.....	89
8.4.3. Analysis of biomarkers and metabolic pathways in subjects working night shifts compared to those working day shifts.....	94
8.4.4 Untargeted metabolomic analysis according to burnout criteria: DP, EE and PA (all participants)	96
8.4.5. Semi-targeted metabolomic analysis according to DP and EE burnout criteria, for three classes of molecules.....	100
8.4.6. Univariate ANOVA analysis applied to metabolic markers associated with the DP, EE and PA criteria, depending on the type of work (day vs night).....	102
8.4.7. Comparative analysis of metabolites separated and identified in urine vs. blood serum.....	104
8.5. Discussions.....	105
8.6. Conclusions.....	106
9. General discussions.....	108
10. General conclusions.....	110

11. Originality and innovative contributions of doctoral research 113

REFERENCE..... 114

Keywords: burnout syndrome, medical staff, emotional exhaustion, depersonalization, occupational stress, biomarkers

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published in extenso as a result of doctoral research

1. **Ungur AP**, Bârsan M, Socaciu AI, Râjnoveanu AG, Ionuț R, Goia L, Procopciuc M. A Narrative Review of Burnout Syndrome in Medical Personnel. *Diagnostics* (Basel). 2024 Sep 6;14(17):1971. doi: 10.3390/diagnostics14171971. PMID: 39272755; PMCID: PMC11393962.
2. **Ungur AP**, Socaciu AI, Barsan M, Rajnoveanu AG, Ionut R, Socaciu C, Procopciuc LM. Urine Metabolomic Patterns to Discriminate the Burnout Levels and Night-Shift-Related Stress in Healthcare Professionals. *Metabolites*. 2025 Apr 14;15(4):273. doi: 10.3390/metabo15040273. PMID: 40278402; PMCID: PMC12029983.
3. **Ungur AP**, Socaciu AI, Barsan M, Rajnoveanu AG, Ionut R, Socaciu C, Procopciuc LM. Blood Metabolic Biomarkers of Occupational Stress in Healthcare Professionals: Discriminating Burnout Levels and the Impact of Night Shift Work. *Clocks Sleep*. 2025 Jul 14;7(3):36. doi: 10.3390/clockssleep7030036. PMID: 40700258.

INTRODUCTION

Burnout syndrome among employees has been correlated with several major risk factors involved in the etiopathogenesis of cardiovascular diseases, psychiatric disorders, and certain types of cancer.

This doctoral thesis aims to investigate burnout syndrome among medical personnel through an integrative approach that considers the specific characteristics of the Romanian healthcare system, the determining factors contributing to the onset and persistence of the syndrome, as well as the pathophysiological mechanisms through which these factors exert their effects.

The methodological design of the study included the use of internationally validated psychometric instruments, in the form of standardized questionnaires, along with the collection of biological samples from a selected cohort of subjects representing various medical specialties. The biological samples were analyzed using high-resolution methods specific to modern metabolomics, employing high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry.

Preliminary results enabled the identification of molecular biomarkers with predictive potential for elevated levels of burnout, revealing significant variations depending on the severity of the syndrome. These findings support the hypothesis of a bidirectional relationship between chronic occupational stress and systemic metabolic alterations.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Burnout syndrome is recognized as a major issue in occupational medicine worldwide, leading to generalized fatigue, professional exhaustion, and job dissatisfaction. This state of chronic stress is characterized by mental exhaustion, physical fatigue, emotional detachment from professional activity, reduced competence, energy depletion, increased irritability, sleep disturbances, and difficulties in concentration. The syndrome can affect individuals across all professions and is often associated with depression and anxiety.

In the case of healthcare personnel, burnout syndrome involves both aspects related to individual personality traits and factors strictly linked to the workplace. A high level of burnout typically begins with emotional exhaustion, progresses to depersonalization, and culminates in a diminished sense of personal accomplishment and low self-esteem.

Assessment of burnout is performed using validated questionnaires designed to evaluate burnout levels; these tools may be uni- or multidimensional, tailored to specific professional domains and workplace contexts.

Burnout prevention can be achieved through the identification and mitigation of risk factors. Studies indicate the existence of both avoidable and unavoidable risk factors, classified as occupational and non-occupational.

Chronic burnout may manifest through cognitive impairment, including memory dysfunction and attention deficits. The pathologies associated with burnout are closely linked to disruptions in daily functioning—most notably, sleep disturbances, which may act as a key trigger for cardiovascular diseases, gastrointestinal disorders, metabolic syndrome, and even psychiatric or oncological conditions.

Healthcare professionals working in rotating shifts are more frequently affected by insomnia, poor-quality sleep, and excessive daytime sleepiness—factors that negatively impact both physical and mental health.

An increased prevalence of obesity, type 2 diabetes, cardiovascular diseases (including hypertension), and gastrointestinal conditions has been reported in these populations. Additionally, such individuals are at elevated risk of experiencing depression and anxiety.

Sleep disorders are also a major contributor to difficulties in attention, concentration, and in processing or executing various work-related tasks.

Among the previously mentioned occupational risk factors, workload, professional experience, and night shift activity play a central role in the development of pathologies related to sleep deprivation, including cardiovascular diseases, cancer, metabolic syndrome, and psychiatric disorders.

Healthcare workers reported high and persistent levels of stress, trauma, and anxiety during the COVID-19 pandemic—partly as a result of uncertainty regarding the evolution of the pandemic and the prolonged period during which they were required to cope with overwhelming workloads.

Given the magnitude and complexity of the impact that burnout syndrome has on physical and mental health, as well as on professional performance, it is imperative to develop and implement coherent prevention and intervention strategies tailored to both the individual and organizational levels.

Such measures should be evidence-based and incorporate multidisciplinary approaches aimed at reducing occupational risk factors, fostering psychological resilience, and promoting an organizational climate that supports mental well-being among employees.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Studiul 1: Risk assessment for burnout syndrome based on questionnaire application

Purpose / Objectives: Assessment of the prevalence of burnout syndrome based on its three dimensions—depersonalization, emotional exhaustion, and personal accomplishment—among medical staff employed in a hospital in Romania

Material and methods: The study was conducted on a cohort of subjects employed at the “George Trifon” Town Hospital in Năsăud, Romania, during the year 2023. Both

medical and administrative staff were included, resulting in a total of 193 participants. All participants provided written informed consent, and data were collected using two sets of standardized questionnaires.

Results: Emotional exhaustion (EE) showed a moderate positive correlation with depersonalization (DP) ($\rho \approx 0.38$, $p < 0.001$), indicating that as the level of exhaustion increases, employees tend to exhibit a higher degree of detachment from patients and professional responsibilities.

At the same time, EE was negatively correlated with personal accomplishment (PA) ($\rho \approx -0.39$, $p < 0.001$), suggesting that a higher level of emotional exhaustion is associated with a decreased sense of self-efficacy and professional satisfaction.

Additionally, DP was negatively correlated with PA ($\rho \approx -0.32$, $p < 0.001$), indicating that as employees become more depersonalized, their perceived sense of professional achievement also declines.

A total of 192 participants also completed a questionnaire concerning their personal experiences and perceptions during the COVID-19 pandemic, structured into six main categories. Each of these categories was analyzed to identify potential correlations with the scores of the three dimensions of burnout syndrome.

Based on Spearman correlation coefficients, several statistically significant associations were identified between the dimensions of the Pandemic Experiences and Perceptions Survey and the Maslach Burnout Inventory (MBI) scores.

Conclusions: In our study, we observed an elevated level of burnout among participants who reported high scores on the emotional exhaustion (EE) dimension—typically the first component affected by excessive workload, shift work, and sleep deprivation.

The risk factors that significantly influenced the level of burnout included: occupational role, years of professional experience, gender, and sleep deprivation.

Notably, medical staff—particularly those working in high-demand departments such as intensive care units (ICU), emergency medicine, or surgery—exhibited significantly higher levels of burnout syndrome compared to administrative personnel.

Study 2. Serum metabolic profile in burnout syndrome expressed by DP, EE and PA criteria

Purpose / Objectives The present study aims to provide new insights into burnout-related biomarkers identified in blood samples collected from participants, and to compare these findings with existing metabolomic data reported in the scientific literature.

Both non-targeted and semi-targeted approaches were employed, allowing for a broader understanding of common and specific biomarkers involved in the metabolic pathways associated with burnout.

Material and methods: A number of 97 healthcare professionals (physicians and nurses) were assessed using the Maslach Burnout Inventory, Healthcare Human Services version for Medical Personnel (MBI-HSS (MP)). Burnout levels were

determined based on the three core dimensions: Emotional Exhaustion (EE), Depersonalization (DP), and Personal Accomplishment (PA).

Responses were collected through face-to-face interviews, and participants were divided into two groups: high burnout (n = 21, high and moderate scores) and low burnout (n = 76). Medical staff were further classified according to working conditions (day/night shifts) and based on their MBI scores across the three dimensions.

Blood samples were collected via venipuncture into sterile vacutainer tubes without anticoagulant, in the morning before breakfast, on the same day as the interview. Serum samples were stored at -80°C until analysis and were labeled with confidential numerical codes. Metabolic profiling was performed using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and positive electrospray ionization (UHPLC-QTOF-ESI⁺-MS).

Results: A total of 99 serum molecules were identified in the study using high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and positive-mode electrospray ionization (HPLC-QTOF-ESI⁺-MS).

The identification of these metabolites was based on the experimental m/z values of the precursor ions [M+1], which were compared with theoretical average values available in the international Human Metabolome Database (HMDB).

An untargeted metabolomic analysis was employed to differentiate the metabolic profiles of night-shift workers from those of day-shift workers, based on data obtained via UHPLC-TOF-ESI⁺-MS.

The identified metabolites were classified into five molecular categories. To evaluate significant differences between the two subject groups, multivariate statistical methods were applied, including Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), Variable Importance in Projection (VIP) scores, Random Forest (RF) analysis, and Heatmap visualization.

Conclusions: In this study, the application of advanced metabolomic technologies led to the identification of four major metabolic pathways involved in the manifestation of burnout, thereby highlighting a significant biological component in the etiopathogenesis of this syndrome.

The metabolic alterations identified involved: Lipid metabolism, particularly steroid hormone synthesis, indicating activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and an endocrine imbalance associated with chronic stress; Amino acid and catecholamine metabolism, with a notable reduction in noradrenaline levels—an essential neurotransmitter involved in the regulation of the stress response; Mitochondrial energy metabolism, emphasizing cellular adaptations to increased energetic demands under conditions of prolonged stress; Lipolysis activation, reflected by elevated levels of free fatty acids and increased phospholipid synthesis, suggesting a compensatory mechanism for energy generation in the context of metabolic stress.

These metabolic pathways provide a strong foundation for the development of preventive and therapeutic strategies targeting burnout, particularly among employees exposed to night shift work.

Study 3. Urinary metabolic profile in burnout syndrome expressed by DP, EE and PA criteria

Purpose / Objectives This study aims to provide new data on burnout biomarkers in urine samples collected from the same subjects and to compare these findings with previously obtained metabolomic data from blood samples.

Non-targeted and semi-targeted approaches allowed for a broader understanding of common and specific biomarkers involved in metabolic pathways associated with burnout, highlighting the relevance of urine as a biofluid for the accurate assessment of professional exhaustion levels.

Material and methods: The investigated sample consisted of 64 healthcare professionals (physicians and nurses) employed at a hospital unit. Biological sample collection was performed for all subjects. At the time of blood sample collection, participants received sterile containers and standardized instructions for urine sample collection. However, some participants did not return urine samples, resulting in a discrepancy between the number of blood samples (n=97) and urine samples (n=64). Urine samples were collected the morning following the interview, around 6:00 AM, before breakfast, in sterile containers, according to the detailed instructions previously provided to participants. For preservation, 0.1% sodium azide (Na-azide) was added to each sample, which was then stored at -80°C until analysis. Each sample was labeled with a confidential numeric code to ensure participant anonymity.

Using UHPLC-QTOF-ESI*MS analysis of urine samples, approximately 850 molecules were separated. The obtained data were processed using Data Analysis 4.2 software. Initially, from the total ion chromatogram (TIC), the base peak chromatogram (BPC) was generated using specific algorithms. Subsequently, a complex matrix was constructed by applying the Find Molecular Features (FMF) algorithm, which included all samples, m/z values representing precursor ions [M+1], retention time, and MS signal intensity, following the methodology previously used for blood serum analysis.

Potential biomarkers associated with metabolic imbalances induced by burnout were selected either based on the specialized literature or through statistical filtering from untargeted analysis. The semi-targeted approach focused on three classes of molecules of interest: polar compounds (including neurotransmitters), steroids, and acylcarnitines, these categories being identified as relevant in the untargeted analysis.

To differentiate subjects according to shift type (day/night) and burnout level (High/Low) across the three dimensions (DP, EE, PA), univariate ANOVA (One-Way ANOVA) was applied, and Fisher's Least Significant Difference (LSD) test was used for post-hoc comparisons. Finally, the Venny 2.1 algorithm (<https://csbg.cnb.csic.es>) was employed to compare the urinary metabolomic profile with the blood metabolomic

profile in order to identify common or specific molecules with potential roles as differentiating biomarkers.

Results: Based on data obtained from UHPLC-TOF-ESI⁺MS analysis, a total of 79 metabolites were selected and identified, grouped into five distinct molecular classes. The molecules were separated using HPLC-QTOF-ESI⁺MS technique and identified based on the precursor ion [M+1] values. To evaluate differences between the two participant groups—Group 0 (day-shift healthcare personnel) and Group 1 (night-shift healthcare personnel)—statistical methods including PLS-DA with VIP scores, Random Forest analysis, and Heatmap visualization were applied.

The results of these analyses revealed significant differences in urinary metabolic profiles between the two professional categories, suggesting a distinct metabolic signature associated with night shift work. Several urinary metabolites were identified with significantly higher levels in the night-shift group compared to the day-shift group. Among these were melatonin, phenyl lactic acid, retinyl linoleate, leucyl-threonine, cortisone, and androstenedione. Conversely, levels of noradrenaline were significantly decreased in the night-shift group, potentially reflecting a neuroendocrine response specific to stress induced by nocturnal activity and circadian rhythm disruption.

The entire set of 79 identified metabolites was concurrently subjected to pathway enrichment analysis, considering p-values and pathway impact scores up to 3.5. From the metabolite cohort selected for statistical analysis, three distinct molecular classes—polar metabolites, acylcarnitines, and steroid metabolites—were identified, taking into account their involvement in metabolic pathways relevant to burnout. For each class, specific statistical analyses were performed using the MetaboAnalyst 5.0 platform, employing aligned matrices and considering burnout criteria of Depersonalization (DP) and Emotional Exhaustion (EE).

Metabolic biomarkers capable of distinguishing between Group 0 (day-shift) and Group 1 (night-shift) were thus identified. For an integrative data approach, univariate ANOVA (One-way ANOVA) was applied to simultaneously compare high (H) and low (L) burnout levels, based on all three dimensions defined by the MBI-HSS questionnaire: Depersonalization (DP), Emotional Exhaustion (EE), and Personal Accomplishment (PA). This analysis highlighted relevant metabolic differences between subjects working day shifts versus night shifts, correlated with the intensity of burnout syndrome.

Conclusions: Three main metabolic pathways have been identified as essential for diagnosing burnout syndrome: Lipid metabolism, with a significant involvement of steroid hormones such as cortisol, cortisone, and androsterone metabolites, suggesting activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the context of chronic stress; energy metabolism, particularly through the role of long-chain acylcarnitines, which act as carriers of free fatty acids and contribute to regulating burnout levels via cellular metabolic adaptations; catecholamine metabolism — neurotransmitters

derived from tyrosine, including dopamine, adrenaline, and noradrenaline — as well as tryptophan metabolism, which includes metabolites of serotonin and melatonin, along with amino acids such as aspartate, arginine, and valine, all relevant in regulating the neuroendocrine response to stress.

GENERAL CONCLUSIONS

The integrated analysis of the three studies highlights that burnout syndrome, particularly among healthcare professionals exposed to chronic stress, shift work, and sleep deprivation, is associated with complex and specific metabolic changes. The data obtained support the existence of a significant biological substrate that can be investigated using advanced metabolomic techniques applied to both blood and urine samples.

Three studies were conducted, starting from a complex experimental design, including the formation of patient groups, establishing inclusion/exclusion criteria, and setting protocols for each study. Specifically:

High-risk workplaces were identified by developing complex questionnaires to assess the level of burnout among medical staff working night shifts;

Using metabolomic technology supported by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS) and multivariate and univariate biostatistics, the serum metabolic profile of patients from the defined groups was established. From the selected cohort of molecules used in statistical analysis, five molecular classes were identified, involved in carbohydrate, lipid, and amino acid turnover metabolism;

A comparative approach using untargeted and semi-targeted metabolomics on categories of metabolites from blood and urine samples was employed to highlight specific biomarkers for burnout syndrome, as well as distinct metabolic profiles between blood and urine (Studies 2 and 3).

The objectives of these studies were achieved, and the results revealed scientifically relevant findings with both clinical and preclinical significance. Specifically:

By processing the data obtained through questionnaires, workplaces and medical professions with a high risk of burnout were identified;

The methodology applied for metabolomic analysis was complemented by multivariate and univariate biostatistical analysis, using the international metabolomics platform MetaboAnalyst 5.0, which proved very useful in identifying statistically relevant differentiating biomarkers and affected metabolic pathways;

The metabolomic analysis results confirmed the disruption and reprogramming of major metabolic pathways involved in the manifestation of burnout, consistent with recent literature. Specifically, the energy metabolism was affected—especially the carbohydrate metabolism—through the alteration of the glycolytic pathway and the biosynthesis of amino acids, particularly tryptophan and kynurenine, which are

precursors and regulators of neurotransmitters and cytokines. Additionally, alterations in nucleotide synthesis precursors were identified;

In urine samples, biomarkers were identified that were either common or specific to those observed in blood, particularly in the metabolism of polar molecules (such as glycolysis-related metabolites, amino acids, selenium complexes, purine and pyrimidine metabolites), as well as in the biosynthesis of fatty acids, acylcarnitines, bile acids, steroid hormones, phospholipids, and prostaglandins—relevant as biomarkers for burnout syndrome.

Through semi-targeted analysis, different metabolite classes and their associated metabolic pathways were identified, involving the metabolism of polar molecules (purine and pyrimidine metabolites, amino acids, selenium complexes), as well as lipid metabolism, including the biosynthesis of bile acids, fatty acids, acylcarnitines, phospholipids, prostaglandins, and steroid hormones—highlighted as more relevant biomarkers.

A common aspect identified was the disturbance in lipid and steroidogenic metabolism, manifested by imbalances in stress hormone levels (cortisol, DHEAS, androstenedione, estrogens) and alterations in the synthesis of phospholipids and lysophospholipids. These imbalances indicate activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and a metabolic adaptation to prolonged stress.

Moreover, the studies revealed disruptions in the metabolism of essential and non-essential amino acids, as well as in the metabolism of neurotransmitters involved in regulating emotional state and stress response, such as tryptophan, serotonin, melatonin, and catecholamines (norepinephrine, dopamine, adrenaline). The role of acylcarnitines, as mediators of fatty acid transport and mitochondrial energy metabolism, emerges as another central element in cellular adaptation to occupational stress.

The metabolic profile confirmed that urine is a valuable and non-invasive biological matrix for monitoring metabolic changes associated with burnout, offering the advantage of reflecting metabolic turnover dynamics and circadian imbalances. This opens new perspectives for developing clinical biomarkers useful for diagnosis and for assessing the progress of therapeutic interventions.

Identified limitations—such as sample size, gender imbalance, and uncontrolled confounding factors—indicate the need for prospective studies on larger and more diverse cohorts, to validate these biomarkers and gain deeper insights into the biochemical mechanisms involved in burnout.

Finally, integrating these findings into occupational health policies and implementing preventive measures and strategies tailored to employees—especially those working night shifts—are essential steps in reducing the impact of burnout and promoting mental health in the workplace.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF DOCTORAL RESEARCH

One of the defining elements of the originality of this study lies in the application of metabolomics in the context of occupational burnout: unlike most studies that focus solely on psychometric or clinical aspects, this research explores the biological substrate of burnout, offering a multidisciplinary perspective that combines metabolic biomarkers with validated psychological measurements.

The comparative analysis between day shifts and night shifts: studying the metabolic differences associated with night shift work—a major stress factor that is underexplored in the specialized literature—contributes to understanding the impact of circadian dysfunction on the mental and metabolic health of medical personnel.

The use of urine as a biological fluid for detecting burnout biomarkers: this represents an important methodological novelty, providing a non-invasive and accessible alternative for monitoring the physiological state of employees, with potential clinical applications and occupational health surveillance.

Identification of specific metabolic pathways involved in burnout: highlighting the role of lipid metabolism, amino acids, neurotransmitters, and mitochondrial energy systems offers a solid scientific basis for developing personalized therapeutic and preventive strategies that can be applied in high-risk professional settings.

The integrative and interdisciplinary approach: combining metabolomic data with standardized burnout scores (MBI) and analyzing occupational risk factors demonstrates the potential of this method for developing objective diagnostic tools and targeted interventions.