



**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny**

Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki

mgr farm. Anna Rajska

***Ocena patogenezы hiperandrogenizmu oraz zaburzeń
metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych
jajników przy użyciu analizы metabolomicznej***

Promotorzy pracy:

Prof. dr hab. n. farm. Michał Jan Markuszewski

Prof. dr hab. n. med. Dominik Rachoń

Opiekun naukowy:

Dr hab. inż. Magdalena Buszewska-Forajta

Gdańsk, 2023



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Projekt „Wielomodułowy program poprawy efektywności i jakości funkcjonowania Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020

Praca doktorska finansowana była ze środków Narodowego Centrum Nauki
w ramach realizacji grantu PRELUDIUM nr 2018/31/N/NZ7/03781
(kierownik projektu mgr farm. Anna Rajska)

oraz

projektu POWR.03.02.00-00-I035/16-00 współfinansowanego przez Unię Europejską
ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego
Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Podziękowania

W pierwszej kolejności pragnę serdecznie podziękować Panu Prof. dr hab Michałowi Markuszewskiemu za przyjęcie mnie do swojego zespołu i możliwość realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Dziękuję za zaufanie, wyrozumiałość, wsparcie i wiarę w moje możliwości.

Bardzo dziękuję również Panu Prof. dr hab Dominikowi Rachoniowi za pozyskanie materiału do badań, wsparcie merytoryczne oraz cenne wskazówki.

Szczególnie dziękuję Pani Dr hab. inż. Magdalenie Buszewskiej-Forajta za pomoc na każdym etapie pracy, poświęcony czas i motywację do dalszych działań.

Dziękuję wszystkim pracownikom i doktorantom Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki, w szczególności Pani Dr hab. Danucie Siluk, prof. uczelni, Joannie Raczak-Gutknecht, Szymonowi Macioszkowi, Pawłowi Witykowi, Renacie Wawrzyniak oraz Wiktorii Struck-Lewickiej za wszelką pomoc i serdeczną atmosferę podczas realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję mojej rodzinie za bezgraniczną wiarę we mnie a przede wszystkim z całego serca dziękuję mojemu mężowi za cierpliwość i ogromne wsparcie każdego dnia.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	5
STRESZCZENIE	8
ABSTRACT	10
LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD PRACY DOKTORSKIEJ	12
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
1. Wstęp.....	13
2. Zespół policystycznych jajników	14
2.1 Etiopatogeneza	14
2.2 Kryteria diagnostyczne.....	15
2.2.1 Hiperandrogenizm.....	17
2.2.2 Zaburzenia owulacji.....	18
2.2.3 PCOM	19
2.3 Aktualne strategie terapeutyczne	19
3. Analiza metabolomiczna.....	22
3.1 Strategie badawcze stosowane w metabolomice.....	22
3.1.1 Niecelowana analiza metabolomiczna	23
3.1.2 Celowana analiza metabolomiczna.....	26
3.2 Techniki analityczne wykorzystywane w metabolomice	27
II. CEL PRACY	30
III. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	31
Rozdział I. Zespół policystycznych jajników w ujęciu metabolomicznym.....	31
(Publikacja nr 1 - <i>Metabolomic insight into polycystic ovary syndrome: an overview</i>)	31
Rozdział II. Niecelowana analiza metabolomiczna próbek surowicy krwi.....	32
(Publikacja nr 2 - <i>Identification of the metabolic fingerprints in women with polycystic ovary syndrome using the multiplatform metabolomics technique</i>).....	32
Rozdział III. Walidacja metabolitów wyselekcjonowanych w próbkach surowicy krwi oraz niecelowana analiza metabolomiczna próbek moczu	34
(Publikacja nr 3 - <i>Searching for the primary metabolic alterations of polycystic ovary syndrome by application of the untargeted metabolomics approach</i>)	34
Rozdział IV. Celowana analiza metabolomiczna wybranych hormonów steroidowych w próbkach moczu	37
(Publikacja nr 4 - <i>Determination of urinary androgens in women with polycystic ovary syndrome using LC-QqQ/MS and application of thin film solid phase microextraction (TF-SPME)</i>) - w recenzji	37
IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	39
V. BIBLIOGRAFIA.....	41
VI. OŚWIADCZENIA	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

WYKAZ SKRÓTÓW

AES&PCOS	ang. <i>Androgen Excess and PCOS Society</i> Amerykańskie Towarzystwo Nadmiaru Androgenów i PCOS
AN-DIONE	ang. <i>androstenedione</i> , androstenedion
AN	ang. <i>androsterone</i> , androsteron
AMDIS	ang. <i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
AMH	ang. <i>anti-müllerian hormone</i> , hormon antymüllerowski
ANOVA	ang. <i>analysis of variance</i> , analiza wariancji
BMI	ang. <i>body mass index</i> , wskaźnik masy ciała
BSTFA	ang. <i>N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i> , N,O bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
CE	ang. <i>capillary electrophoresis</i> , elektroforeza kapilarną
QA	ang. <i>quality assurance</i> , zapewnienie jakości
QC	ang. <i>quality control samples</i> , próbki kontrolne
DHEA-S	ang. <i>dehydroepiandrosterone sulfate</i> , siarczan dehydroepiandrosteronu
DHT	ang. <i>5α-dihydrotestosterone</i> , 5 α -dihydrotestosteron
dMRM	ang. <i>direct multiple reactions monitoring</i> , bezpośrednie monitorowanie reakcji wielokrotnych
ELISA	ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , test immunoenzymatyczny
ESI	ang. <i>electrospray ionization</i> , jonizacja typu elektrozpylanie
FAI	ang. <i>Free Androgen Index</i> , współczynnik wolnych androgenów
FSH	ang. <i>follicle-stimulating hormone</i> , hormon folikulotropowy
FTIR	ang. <i>fourier transform infrared spectroscopy</i> , spektroskopia fourierowska w podczerwieni
GC	ang. <i>gas chromatography</i> , chromatografia gazowa
GLUT4	ang. <i>glucose transporter type 4</i> , transporter glukozy typu 4
GnRH	ang. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> , gonadoliberyna
HMDB	ang. <i>Human Metabolome Database</i> , baza danych metabolomu ludzkiego
HPLC	ang. <i>high performance liquid chromatography</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa
HILIC	ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , chromatografia oddziaływań hydrofilowych

LC	ang. <i>liquid chromatography</i> , chromatografia cieczowa
LH	ang. <i>luteinizing hormone</i> , hormon luteinizujący
LLE	ang. <i>liquid-liquid extraction</i> , ekstrakcja ciecz-ciecz
LPC	ang. <i>lysophosphatidylcholine</i> , lizofosfatydylocholina
LOD	ang. <i>laparoscopic ovarian drilling</i> , laparoskopowa diatermia jajników
NMR	ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> , spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
NP	ang. <i>normal phase</i> , normalny układ faz
MALDI	ang. <i>matrix-assisted laser desorption ionization</i> , laserowa jonizacja wspomagana matrycą
MS	ang. <i>mass spectrometry</i> , spektrometria mas
NIH	ang. <i>National Institute of Health</i> , Narodowy Instytut Zdrowia
NIST	ang. <i>National Institute of Standards and Technology Library</i> , Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii
OCP	ang. <i>oral contraceptive pills</i> , doustne leki antykoncepcyjne
OPLS-DA	ang. <i>orthogonal partial least squares discriminant analysis</i> , ortogonalna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną
PCA	ang. <i>partial least square discriminant analysis</i> , analiza składowych głównych
PCOS	ang. <i>polycystic ovary syndrome</i> , zespół policystycznych jajników
PCOM	ang. <i>polycystic ovary morphology</i> , morfologia policystycznych jajników
PLS-DA	ang. <i>partial least square discriminant analysis</i> , analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów
RIA	ang. <i>radioimmunoassay</i> , metoda radioimmunologiczna
RF	ang. <i>random forest</i> , metoda lasów losowych
ROC	ang. <i>Receiver Operating Characteristic</i> , charakterystyka operacyjna odbiornika
RP	ang. <i>reversed phase</i> , odwrócony układ faz
SHBG	ang. <i>sex hormone binding globulin</i> , białko wiążące hormony płciowe
SPE	ang. <i>solid phase extraction</i> , ekstrakcja ciecz-ciało stałe
SVM	ang. <i>support vector machine</i> , metoda wektorów nośnych
T	ang. <i>testosterone</i> , testosteron

TF-SPME	ang. <i>thin film solid phase microextraction</i> , cienkowarstwowa mikroekstrakcja do fazy stałej
TMCS	ang. <i>trimethylchlorosilane</i> , trimetylochlorosilan
TOF	ang. <i>time-of-flight analyzer</i> , analizator czasu przelotu
TripleTOF	ang. <i>triple quadrupole time-of-flight</i> , analizator czasu przelotu sprzężony z analizatorem typu potrójny kwadrupol
QqQ	ang. <i>triple quadrupole analyzer</i> , analizator typu potrójny kwadrupol
QTOF	ang. <i>quadrupole time-of-flight analyzer</i> , analizator czasu przelotu sprzężony z analizatorem kwadrupolowym
USG TV	ang. <i>transvaginal ultrasonography</i> , USG przezpochwowe

STRESZCZENIE

Zespół policystycznych jajników (z ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS) stanowi jedno z najczęściej diagnozowanych zaburzeń endokrynnych w populacji kobiet w wieku reprodukcyjnym. Dotyka ono od 5% do 20% kobiet i jest jedną z głównych przyczyn niepłodności spowodowanej zaburzeniami owulacji. Dlatego, od wielu lat podejmowane są próby wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw rozwoju tego zespołu. Niestety, złożoność zaburzeń oraz zróżnicowany obraz kliniczny sprawia, iż zrozumienie dokładnej patofizjologii i opracowanie skutecznej diagnostyki wciąż stanowi ogromne wyzwanie i jest przedmiotem wielu badań.

Jednym z podejść, które w ostatnich latach cieszy się rosnącym zainteresowaniem wśród badaczy jest analiza metabolomiczna, która umożliwia ocenę zmian zachodzących w organizmie na poziomie molekularnym. Istotne znaczenie w podejściu metabolomicznym ma zastosowanie zintegrowanej strategii łączącej analizy jakościowe z oznaczeniami ilościowymi. Pozwala to na uzyskanie pełnego obrazu zmian w badanym metabolomie i przyczynia się do poznania i zrozumienia złożonych procesów metabolicznych zaburzonych na skutek rozwoju choroby.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena jakościowa oraz ilościowa zmian w metabolomie pacjentek z PCOS z zastosowaniem podejścia metabolomicznego.

W pierwszym etapie badań została przeprowadzona niecelowana analiza metabolomiczna dwóch matryc biologicznych (surowicy i moczu), z zastosowaniem komplementarnych technik analitycznych tj. wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas i analizatorem czasu przelotu (z ang. *high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*, HPLC-TOF/MS) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas i analizatorem typu potrójny kwadrupol (z ang. *gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, GC-QqQ/MS). Dane uzyskane w wyniku oznaczeń zostały poddane procesowaniu oraz jedno- i wielowymiarowej analizie statystycznej, co pozwoliło na wyselekcjonowanie panelu związków istotnie zmienionych w grupie pacjentek z PCOS.

W kolejnym etapie pracy, przeprowadzono celowaną analizę metabolomiczną wybranych androgenów w próbkach moczu, które zidentyfikowano w ramach oznaczeń jakościowych jako jedne z najbardziej istotnych w kontekście patofizjologii PCOS. Badania ilościowe przeprowadzono z wykorzystaniem zwalidowanej metody analitycznej oraz zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz analizatorem typu potrójny kwadrupol (z ang. *high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, HPLC-QqQ/MS).

Wyniki uzyskane w ramach niecelowanej analizy metabolomicznej pozwoliły na identyfikację najważniejszych szlaków biochemicznych zaburzonych w przebiegu

PCOS. Zauważono m.in., iż większość zaburzeń pojawiających się na poziomie komórkowym związanych jest z działaniem insuliny, co wskazuje na jej istotne znaczenie w patofizjologii tego zespołu. Ponadto, opracowanie czulej i specyficznej metody oznaczania androgenów umożliwiło dokładne oznaczenie poziomu wytypowanych związków oraz weryfikację ich potencjału diagnostycznego.

Kompleksowe spojrzenie na PCOS z perspektywy zintegrowanego podejścia metabolomicznego pozwoliło zarówno globalnie ocenić metabolom pacjentek poprzez identyfikację metabolitów istotnie zmienionych w wyniku rozwoju PCOS, jak również skupić się na dokładnym określeniu kierunku zmian zachodzących w konkretnym szlaku biochemicznym. Ma to kluczowe znaczenie dla szerszego zrozumienia patofizjologii zespołu PCOS i otwiera możliwości do opracowania bardziej skutecznych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most commonly diagnosed endocrine disorders in the population of women of reproductive age. It affects between 5% and 20% of women and is the main of the leading causes of infertility due to anovulation. Therefore, efforts have been made for many years to clarify the mechanisms underlying the development of this syndrome. Unfortunately, the complexity of the disorder and the varied clinical picture means that understanding the exact pathophysiology and the development of an effective diagnosis is still extremely challenging and the subject of intensive research.

One approach that has attracted increasing interest among researchers in recent years is metabolomics, which makes it possible to assess changes occurring in the living organism at the molecular level. Of significant importance in the metabolomic approach is the use of an integrated strategy combining qualitative analyses with quantitative determinations. It allows for receiving a complete picture of changes in the metabolome under study, and it contributes to an in-depth understanding of the complex metabolic processes disrupted by the development of diseases.

The aim of this doctoral dissertation was to qualitatively and quantitatively assess the changes in the metabolome of women with PCOS using the metabolomic approach.

In the first stage of the study, an untargeted metabolomic analysis of two biological matrices (serum and urine) was carried out using complementary analytical techniques, i.e. high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) and gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ/MS). The received data were processed and subjected to univariate and multivariate statistical analysis, which allowed to select a panel of compounds significantly altered in the group of women with PCOS.

At the next stage of the study, targeted metabolomic analysis of selected androgens in urine samples was performed, which were selected by qualitative assays as the most relevant in the context of the PCOS' pathophysiology. Quantitative studies were carried out using a validated analytical method and employing high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-QqQ/MS).

The results of the untargeted metabolomic analysis allowed to identify the most important biochemical pathways impaired by the development of PCOS. It was noted, among other things, that most of the disorders occurring at the molecular level are related to the insulin action, indicating its important role in the pathophysiology of PCOS. In addition, the development of a sensitive and specific method for the determination of androgens made it possible to accurately determine the levels of the selected compounds and verify their diagnostic potential.

The comprehensive view of PCOS from the perspective of an integrated metabolomic approach allows to globally assess patient metabolome by identifying metabolites significantly altered by the syndrome, as well as to focus on the accurate determination the direction of changes occurring in a specific biochemical pathway. It is crucial for a broader understanding of its pathophysiology and up opportunities to the development of more effective diagnostic and therapeutic strategies.

LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD PRACY DOKTORSKIEJ

1. **Rajska A.**, Buszewska-Forajta M., Rachoń D., Markuszewski M. J., Metabolomic insight into polycystic ovary syndrome: an overview, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 4853, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21144853>
(IF=5.924; MNiSW: 140,000)
2. Buszewska-Forajta M., Rachoń D., **Stefaniak A.**, Wawrzyniak R., Konieczna A., Kowalewska A., Markuszewski M.J., Identification of the metabolic fingerprints in women with polycystic ovary syndrome using the multiplatform metabolomics technique, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186 (2019) 176-184, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.10.012>
(IF=3.813; MNiSW: 100,000)
3. **Rajska A.**, Buszewska-Forajta M., Macioszek S., Wawrzyniak R., Wityk P. Berg A., Kowalewska A., Rachoń D., Markuszewski M. J., Searching for the primary metabolic alterations of polycystic ovary syndrome by application of the untargeted metabolomics approach, *J Pharm Biomed Anal* 235 (2023) 115602, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115602>
(IF=3.4; MNiSW: 100,000)
4. **Rajska A.**, Raczak-Gutknecht J., Struck-Lewicka W., Buszewska-Forajta M., Wityk P., Verding P., Kowalewska A., Siluk D., Rachoń D., Markuszewski M.J., Determination of urinary androgens in women with polycystic ovary syndrome using LC-QqQ/MS and application of thin film solid phase microextraction (TF-SPME) – praca w trakcie recenzji na dzień złożenia pracy doktorskiej

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wstęp

Intensywny rozwój nauk z zakresu biologii systemowej (genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika) oraz ich rosnący potencjał w kierunku lepszego zrozumienia procesów chorobowych, otwiera nowe możliwości w poszukiwaniu innowacyjnych narzędzi diagnostycznych, które stanowią wyzwania współczesnej medycyny i farmacji. Odkrycie genomu człowieka stało się przełomem w skutecznej diagnostyce, leczeniu i zrozumieniu przyczyn wielu chorób. Jednakże, wraz z postępem wiedzy okazało się, iż sama informacja genetyczna oraz badanie proteomu nie są wystarczające do pełnego zrozumienia zmian zachodzących w organizmie człowieka na poziomie komórkowym. Przyczyniło się to do rozwoju metabolomiki, kolejnej nauki „omicznej”, stanowiącej uzupełnienie badań genomicznych i proteomicznych. Profil metaboliczny obrazuje nie tylko fenotyp uwarunkowany genetycznie, ale również działanie czynników zewnętrznych tj. dieta, przyjmowane leki czy środowisko zewnętrzne i odzwierciedla każde zaburzenie homeostazy organizmu. Fakt ten umożliwia śledzenie rozwoju danej choroby poprzez obserwację zmian zachodzących na poziomie metabolomu. To alternatywne spojrzenie na chorobę z perspektywy produktów przemian metabolicznych, przyczynia się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów powstawania schorzeń, co stwarza nowe możliwości skutecznego wykrywania, leczenia oraz prewencji wielu jednostek chorobowych [1].

Aktualnie zastosowanie podejścia metabolomicznego cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem w diagnostyce chorób cywilizacyjnych tj. cukrzyca, otyłość, choroby układu krążenia, nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne [2]. Oprócz tego podejmowane są próby zastosowania „metabolomiki” w celu lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za coraz częściej występujący problem niepłodności [3]. Z uwagi na złożoność tego zjawiska i mnogość przyczyn, wymagane jest indywidualne podejście w diagnostyce i leczeniu. Dlatego też, analiza metabolomiczna staje się coraz bardziej obiecującym narzędziem w tym obszarze badań, które może prowadzić do identyfikacji czynników ryzyka, poprawy diagnostyki, dostosowania odpowiedniej terapii czy weryfikacji zmian w trybie życia pacjentów, które mogą wnieść pozytywny wpływ na poprawę płodności, a tym samym pomóc wielu parom w spełnieniu marzenia o posiadaniu potomstwa.

2. Zespół policystycznych jajników

Zespół policystycznych jajników jest jednym z najczęściej diagnozowanych zaburzeń hormonalnych u kobiet w wieku reprodukcyjnym [4]. Zaburzenie to, jako zespół objawów, zostało po raz pierwszy opisane w 1935 roku przez dwóch lekarzy Steina i Leventala, stąd też nazywane jest niekiedy zespołem Steina-Leventala. Jego złożona etiologia oraz zróżnicowany obraz kliniczny sprawiają, że właściwa diagnoza i skuteczne leczenie stanowi obecnie wyzwanie dla wielu doświadczonych lekarzy oraz naukowców i wymaga interdyscyplinarnego podejścia [5]. Większość objawów charakterystycznych dla PCOS spowodowana jest występowaniem zaburzeń równowagi hormonalnej, a jako główne manifestacje PCOS wymieniane są zaburzenia owulacji, nadmierna produkcja androgenów, a także obecność wielu drobnych torbieli w jajnikach. Oprócz dysfunkcji hormonalnych, u kobiet cierpiących na PCOS często obecne są także inne zaburzenia metaboliczne takie jak: insulinooporność i związany z nią kompensacyjny hiperinsulinizm, dyslipidemia, otyłość, przewlekły stan zapalny, co w konsekwencji zwiększa ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2 oraz chorób układu sercowo - naczyniowego [6,7] a w dłuższej perspektywie może prowadzić do wystąpienia raka endometrium [8]. Ponadto, zachwiana gospodarka hormonalna z widocznymi oznakami nadmiaru androgenów przyczynia się do rozwoju depresji [5]. Z uwagi, iż PCOS diagnozowany jest często w grupie kobiet mających trudność z zajściem w ciążę, uznawany jest za jedną z głównych przyczyn niepłodności [9].

2.1 Etiopatogeneza

Poszukiwanie mechanizmów leżących u podstaw rozwoju PCOS jest tematem badań od wielu lat. Ciągłe poszerzanie wiedzy w tym zakresie umożliwiło lepsze rozumienie wielu zaburzeń związanych z tym zespołem, jednakże dokładny patomechanizm jego postawania nie został do dziś ostatecznie wyjaśniony [10]. Wiadomo, że etiologia PCOS jest wieloczynnikowa a zgodnie z aktualnym stanem wiedzy rozpatrywane są trzy główne modele patofizjologiczne: gonadotropinozależny, jajnikowy oraz insulinozależny [11].

W modelu gonadotropinozależnym podkreśla się dominujące znaczenie zwiększonego wydzielania hormonu luteinizującego (z ang. *luteinizing hormone*, LH) w porównaniu do hormonu folikulotropowego (z ang. *follicle-stimulating hormone*, FSH). Jednakże brak jest jednoznacznych danych dotyczących pierwotnej roli wysokiego poziomu LH. Najprawdopodobniej jest to związane ze zwiększoną częstotliwością pulsacyjnego wydzielania gonadoliberyny (z ang. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH), co zaburza stosunek LH/FSH [12]. Nadmiernie wysokie stężenie LH w odniesieniu do FSH uniemożliwia właściwe dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych oraz przebieg procesu owulacji. [13,14].

Model jajnikowy z kolei wskazuje, że nadmierna produkcja androgenów przez komórki tekalne, jest jedną z głównych przyczyn hiperandrogenizmu odpowiedzialnego za zaburzenie prawidłowego funkcjonowania układu hormonalnego u kobiet. Dysfunkcja związana z nadmierną aktywacją pęcherzyków jajnikowych, a także brakiem możliwości wyselekcjonowania pęcherzyka dominującego może być spowodowana niewystracającą wrażliwością na działanie FSH oraz nadmierną ekspozycją na działanie androgenów [12]. Każdy z dojrzewających pęcherzyków antralnych stymuluje wydzielanie hormonu antymüllerowskiego (z ang. *anti-müllerian hormone*, AMH). Tak więc konsekwencją zwiększona ilość pęcherzyków jest wzrost stężenia hormonu AMH [15]. Nadmierne stężenie AMH, z kolei obniża wrażliwość pęcherzyków na działanie FSH [16] oraz blokuje przemiany biochemiczne androgenów do estrogenów poprzez hamowanie aktywności enzymatycznej i w konsekwencji prowadzi do wystąpienia hiperandrogenizmu [17].

Trzeci model zakłada, że insulinooporność oraz kompensacyjny hiperinsulinizm odgrywa kluczową rolę w patofizjologii PCOS. Nadmiar insuliny, działając synergistycznie z LH, pobudza produkcję androgenów przez komórki tekalne jajników [18], jak również hamuje wątrobową produkcję białka wiążącego hormony płciowe (z ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG) [19]. Oba te mechanizmy przyczyniają się do nadmiaru androgenów prowadzących do zaburzeń owulacji oraz manifestujących się w postaci klinicznych objawów. Etiologia zmniejszonej wrażliwości na insulinę w PCOS pozostaje niejasna, chociaż podejrzewane są dysfunkcje genetyczne prowadzące do defektów w produkcji i działaniu głównego insulinozależnego transportera glukozy typu 4 (z ang. *glucose transporter type 4*, GLUT4) w komórkach tkanki tłuszczowej [20]. Ponadto, zauważono, że stopień insulinooporności wzrasta w wyniku przewlekłego stanu zapalnego, częściowo wywołanego przez nieprawidłową produkcję i działanie adipocytokin, wydzielanych przez komórki tkanki tłuszczowej [21].

Oprócz wymienionych wyżej mechanizmów, przyczyn PCOS upatruje się również w podłożu genetycznym. Dlatego też, ciągle analizowane są różne geny, których zaburzenie ekspresji może prowadzić do występowania zaburzeń charakterystycznych dla PCOS np. geny odpowiedzialne za syntezę hormonów steroidowych, ekspresję gonadotropin, działanie insuliny czy rozwój pęcherzyków jajnikowych [22]. Badania wykazały, że stopień dziedziczenia genów odpowiedzialnych za wystąpienie PCOS wynosi poniżej 10 % [23], co sugeruje, że działanie czynników epigenetycznych tj. czynniki środowiskowe, dieta, tryb życia, odgrywa istotną rolę w etiologii PCOS [5].

2.2 Kryteria diagnostyczne

Rozpoznanie PCOS stawiane jest w oparciu o trzy główne objawy: kliniczny lub/i biochemiczny hiperandrogenizm, występowanie oligoowulacji bądź całkowity jej brak oraz obecność policystycznych jajników (z ang. *polycystic ovary morphology*, PCOM) w obrazie USG przezpochwowym (z ang. *transvaginal ultrasonography*, USG TV).

Konieczne jest również wykluczenie innych zaburzeń, które mogą powodować zaburzenia miesiączkowania np. zaburzenia czynności tarczycy, hiperprolaktynemia lub prowadzić do hiperandrogenizmu np. wrodzony przerost nadnerczy lub guzy wydzielające androgeny. Pierwsze kryteria diagnostyczne tzw. kryteria klasyczne zostały opublikowane w 1990 roku przez Narodowy Instytut Zdrowia (z ang. *National Institute of Health*, NIH), według których do rozpoznania PCOS konieczne jest występowanie dwóch objawów: klinicznego lub/i biochemicznego hiperandrogenizmu oraz oligoowulacji. Obecność PCOM w badaniu USG TV nie jest konieczne do postawienia rozpoznania zespołu. W roku 2003, podczas konferencji w Rotterdamie, wprowadzono pewne modyfikacje do obowiązujących wówczas kryteriów i uzupełniono wymagania o obecność PCOM, jednakże dopuszczono możliwość rozpoznania PCOS np. bez cech hiperandrogenizmu. W 2006 roku natomiast, Amerykańskie Towarzystwo Nadmiaru Androgenów i PCOS (z ang. *Androgen Excess and PCOS Society*, AES&PCOS) ponownie uznało obecność hiperandrogenizmu jako niezbędne kryterium diagnostyczne [24]. Zestawienie powyższych kryteriów zostało opisane w tabeli nr 1. W zależności od zastosowanych kryteriów, częstość występowania PCOS jest zróżnicowana. Zgodnie z kryteriami NIH wynosi ona od 5 % do 10 %, natomiast według wytycznych AES&PCOS od 10 % do 15 %. Z kolei w oparciu o najczęściej stosowane kryteria rotterdamskie, PCOS diagnozowane jest wśród 5 % do 20 % kobiet w wieku rozrodczym [25].

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne zespołu policystycznych jajników.

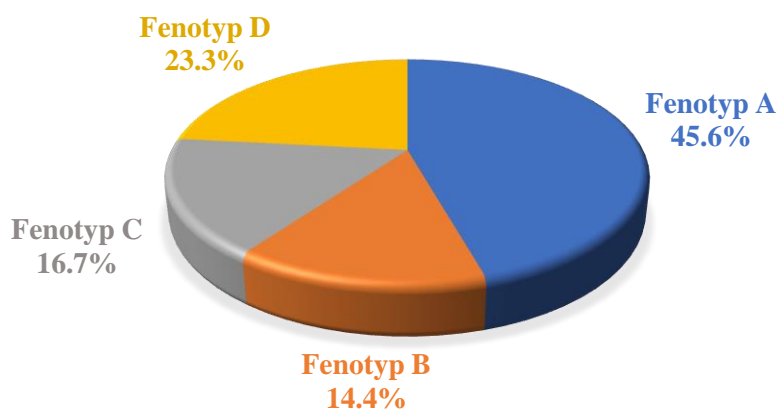
Kryteria diagnostyczne	Objawy	Wymagania
Kryteria NIH (1990)	1. Biochemiczny i kliniczny hiperandrogenizm 2. Przewlekły brak owulacji	Spełnienie obu kryteriów
Kryteria rotterdamskie (2003)	1. Biochemiczny i kliniczny hiperandrogenizm 2. Oligoowulacja/ brak owulacji 3. Obecność PCOM	Spełnienie 2 z 3 kryteriów
Kryteria AES&PCOS (2006)	1. Biochemiczny i kliniczny hiperandrogenizm 2. Zaburzenie czynności jajników pod postacią zaburzeń owulacji lub/i PCOM	Spełnienie obu kryteriów

W zależności od „konstelacji” objawów PCOS, wyróżnia się 4 fenotypy zespołu: fenotyp A, fenotyp B, fenotyp C i fenotyp D. Kobiety z PCOS o fenotypie A i B są określane jako pacjentki z tzw. klasycznym PCOS. Fenotyp A to pełnoobjawowy obraz zespołu i jest rozpoznawany u większości pacjentek. Fenotyp B charakteryzuje kobiety u których występuje hiperandrogenizm i zaburzenia owulacji, natomiast nie stwierdza się

obrazu PCOM w USG TV. Badania wykazują, iż pacjentkom o klasycznym fenotypie często towarzyszy insulinooporność, hiperinsulinizm oraz zwiększone ryzyko rozpoznania zespołu metabolicznego a co za tym idzie rozwój otyłości centralnej i dyslipidemii [26]. Ponadto, w grupie pacjentek o pełnoobjawowym fenotypie A odnotowuje się zwiększone stężenie hormonu AMH w porównaniu do innych fenotypów [27]. Fenotyp C, z kolei, nazywany jest fenotypem owulacyjnym, w którym dominujące objawy to obecność hiperandrogenizmu oraz PCOM, jednakże bez zaburzeń owulacji. W tej grupie pacjentek obserwuje się niższy poziom androgenów, insuliny, dyslipidemii oraz skłonności do zaburzeń metabolicznych [28]. Ostatni fenotyp D określany jest jako normoandrogeniczny i charakteryzuje się najłagodniejszym stopniem zaburzeń endokrynologicznych i metabolicznych [29]. Podział fenotypów przedstawiono w tabeli nr 2 a udział procentowy każdego z fenotypów w populacji kobiet z PCOS przedstawia wykres poniżej (Rys. 1).

Tabela 2. Fenotypy PCOS w zależności od występujących objawów.

	<i>Kryteria NIH</i>			
	<i>Kryteria AES&PCOS</i>			
	<i>Kryteria rotterdamskie</i>			
	Fenotyp A	Fenotyp B	Fenotyp C	Fenotyp D
Hiperandrogenizm	+	+	+	-
Zaburzenia owulacji	+	+	-	+
PCOM	+	-	+	+



Rysunek 1. Rozkład fenotypów w populacji kobiet z PCOS [30].

2.2.1 Hiperandrogenizm

Według kryteriów AE&PCOS kliniczny i/lub biochemiczny hiperandrogenizm jest podstawowym elementem diagnostycznym PCOS. Główne objawy kliniczne obejmują hirsutyzm, trądzik i łysienie androgenowe [31]. Jednakże, trądzik i łysienie, których występowanie szacuje się odpowiednio u 12%–14% i 5%–50% kobiet z PCOS,

uważane są za mniej dokładne wskaźniki hiperandrogenizmu z powodu braku jednolitego systemu oceny, a także z uwagi na fakt, iż mogą występować jako objawy innych zaburzeń, nie związanych z nadmiarem androgenów [32]. Hirsutyzm, określane jako obecność u kobiet owłosienia w typowo męskich obszarach ciała, jest głównym wskaźnikiem klinicznego nadmiaru androgenów i występuje u 65%–75% kobiet z PCOS [8]. Stopień wzrostu włosów terminalnych oceniany jest wizualnie za pomocą tzw. skali Ferrimana-Gallweya w dziewięciu androgenozależnych okolicach ciała. W tym celu przypisywane są punkty w skali od 0 (brak widocznych włosów) do 4 (znaczne) a sumaryczna wartość ≥ 8 stanowi wskazanie do dalszej diagnostyki [33].

Rozpoznanie biochemicznego hiperandrogenizmu jest kluczową kwestią w celu ustalenia właściwej diagnozy PCOS, z uwagi, że ocena klinicznego hiperandrogenizmu może być wysoce subiektywna. Wykonanie badań laboratoryjnych skupia się na pomiarze stężenia takich hormonów steroidowych jak całkowity testosteron (T), androstenedion (AN-DIONE) oraz siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEA-S). Ponadto, w celu wyliczenia współczynnika wolnych androgenów (z ang. *Free Androgen Index*, FAI), niezbędne jest również oznaczenie zawartości globuliny wiążącej hormony płciowe (z ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG) [5]. Otrzymanie wiarygodnych wyników pomiarów hormonalnych jest kluczowe, jednakże dokładność i precyzja uzyskanych wyników może się różnić się w zależności od użytej metody. Niestety, czułość oraz specyficzność wielu, komercyjnie dostępnych metod jest niewystarczająca, aby oznaczyć u kobiet występujące w bardzo niskich stężeniach androgeny [5,31]. Stosowanie prostych testów immunoenzymatycznych tj. ELISA (z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), czy bezpośrednich metod radioimmunologicznych (z ang. *radioimmunoassay*, RIA), pomimo szybkości oraz łatwości w prowadzeniu oznaczeń, jest dyskusyjne ze względu na wiarygodność otrzymywanych wyników [34,35]. Do analiz stężeń hormonów steroidowych, szczególnie rekomenduje się zastosowanie technik chromatograficznych łączonych ze spektrometrią mas lub metodami RIA. Ich zastosowanie, pomimo wymogu czasowego, sprzętowego oraz bardziej skomplikowanej obróbki materiału biologicznego, umożliwia określenie pełnego profilu hormonalnego w bardzo szerokim zakresie stężeń oraz uzyskanie wiarygodnych wyników [35,36]. Z uwagi na zmienność hormonalną wynikającą z rytmu dobowego oraz cyklu miesięczkowego, istotne jest także pobranie próbek do badań w określonym czasie, najlepiej rano i podczas wczesnej fazy folikularnej lub po krwawieniu [34].

2.2.2 Zaburzenia owulacji

Zaburzenia owulacji, do których zalicza się występowanie rzadkich owulacji (oligoowulacje) lub całkowity brak owulacji (anowulacja) są wykrywane na podstawie długości cyklu menstruacyjnego. Oligoowulacja definiowana jest jako cykl menstruacyjny dłuższy niż 35 dni, co w rezultacie przekłada się na 10 lub mniej cykli w ciągu roku. Niektórzy badacze rozpatrują rzadkie owulacje jako mniej niż 8 cykli

w roku, co odpowiada cyklom o długości większej niż 45 dni [12]. Jednakże, nie wszystkie przypadki oligoowulacji manifestują się jako klinicznie widoczne rzadkie menstruacje. U niektórych kobiet oligoowulacje objawiają się częstym krwawieniem, z kolei inne pacjentki mogą wykazywać pozornie regularne cykle miesięczne. W praktyce klinicznej, w przypadkach, kiedy występowanie owulacji, pomimo normalnej długości cyklu jest wątpliwe, wykonywany jest pomiar poziomu hormonu LH, którego najwyższe stężenie występuje około jeden dzień przed oczekiwaną owulacją lub poziomu progesteronu w fazie lutealnej po wystąpieniu owulacji [37]. Co ciekawe, badanie obejmujące ponad 3700 kobiet w wieku od 20 do 49,9 lat z regularnymi cyklami wykazało, że aż 37% cykli było bezowulacyjnych, gdy zweryfikowano to na podstawie poziomu progesteronu w surowicy w fazie lutealnej [38]. Dlatego też samo występowanie zaburzeń owulacji nie jest wystarczające do diagnozy PCOS, kiedy nie są obecne inne zaburzenia tj. hiperandrogenizm i PCOM.

2.2.3 PCOM

Badanie morfologii jajników wykonywane jest za pomocą USG TV i ma na celu ocenę liczby pęcherzyków antralnych oraz objętości jajnika. Kryteria stosowane u dorosłych kobiet są dokładnie zdefiniowane. PCOM rozpoznawane jest, gdy liczba pęcherzyków o śr. 9-12mm wynosi ≥ 20 i/lub objętość jajnika wynosi ≥ 10 ml [39]. U kobiet, które już prezentują kliniczne objawy nadmiaru androgenów i zaburzenia owulacji, ocena morfologii jajników nie jest kryterium nieodzownym do rozpoznania PCOS [5, 40]. W celu dodatkowej oceny zaburzenia dojrzewania pęcherzyków jajnikowych wykorzystywany jest pomiar hormonu AMH [16].

Prawdziwym wyzwaniem jest postawienie właściwej diagnozy w populacji nastolatek z uwagi na fizjologiczne zmiany zachodzące w dojrzewającym organizmie młodych kobiet [34]. W związku z tym, zastosowanie kryteriów rotterdamskich może prowadzić do mylnej diagnozy, a w konsekwencji może mieć potencjalnie szkodliwe długoterminowe skutki zdrowotne [41]. Dlatego też, w przypadku nastolatek konieczne jest stwierdzenie biochemicznego nadmiaru androgenów oraz dokładne udokumentowanie klinicznych oznak hiperandrogenizmu tj. obecność silnego trądziku i hirsutyzm, a zaburzenia owulacji mogą zostać stwierdzone dopiero po 2-3 latach od pierwszej miesiączki [42]. Ponadto, zaleca się, aby badanie morfologii jajników nie było stosowane jako kryterium diagnostyczne przez okres 8 lat od menarche [39].

2.3 Aktualne strategie terapeutyczne

Zróznicowany obraz kliniczny pacjentek z PCOS oraz niewyjaśniona patogeneza, sprawia, że aktualnie nie ma jednej uniwersalnej metody leczenia. Terapia PCOS zależy od indywidualnych potrzeb danej pacjentki i skupia się przede wszystkim na leczeniu objawowym [4,5]. Główne strategie terapeutyczne zakładają: zmniejszenie nadmiaru

androgenów, przywrócenie owulacji, poprawę funkcji metabolicznych, zapobieganie nadmiernemu przerostowi śluzówki macicy w celu prewencji raka endometrium a także poprawę jakości życia pacjentek w oparciu o aspekt psychologiczny.

Doustne środki antykoncepcyjne (ang. *oral contraceptive pills*, OCP) skutecznie hamują jajnikową produkcję androgenów i są zalecane jako terapia pierwszego rzutu w leczeniu zaburzeń miesiączkowania, hirsutyzmu i trądziku u kobiet z PCOS, którym nie zależy na podtrzymywaniu płodności [43]. OCP hamują uwalnianie gonadotropin i w konsekwencji blokują wydzielanie androgenów jajnikowych. Ponadto komponenta estrogenowa stymuluje wątrobową produkcję SHBG, co w rezultacie zmniejsza wolną frakcję krążących androgenów. Stosowanie OCP znacznie redukuje ryzyko rozrostu błony śluzowej macicy i raka endometrium, jednocześnie zapewniając skuteczną antykoncepcję, w momencie, gdy konieczne jest włączenie leków antyandrogenowych, z uwagi na ich teratogenne działanie na płód [44]. Kontrowersje budzi kwestia, czy należy uwzględniać zwiększone ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, zakrzepów żylnych i współistniejących schorzeń metabolicznych związanych ze stosowaniem OCP, szczególnie, gdy kobiety z PCOS znajdują się już w grupie ryzyka [45].

U kobiet, które wykazują silne objawy hiperandrogenizmu i również nie starają się o dziecko, terapię uzupełnia się o leki antyandrogenowe. Do tej grupy leków zaliczane są blokery receptora androgenowego (np. spironolakton, flutamid, octan cyproteronu) oraz inhibitory 5 α -reduktazy (np. finasteryd) [46]. Bardzo nasilony trądzik dodatkowo może zostać poddany leczeniu retinoidami [47] a łysienie androgenowe przez zastosowanie minoksidilu [48].

W przypadku, pacjentek, dla których nadrzędnym celem jest przywrócenie płodności i zajście w ciążę, w celu indukcji owulacji, stosuje się cytrynian klomifenu lub letrozol [49]. Około 50% pacjentek, które owulują po zastosowaniu klomifenu, zachodzi w ciążę po trzech do pięciu cyklach leczenia [12]. Leczenie klomifenem natomiast wiąże się z ryzykiem hiperstymulacji jajników i pojawienia się ciąży mnogiej, co jest raportowane u 3-8% pacjentek [50]. U kobiet, które nie odpowiadają pozytywnie na stosowane leki, można rozważyć indukcję owulacji za pomocą gonadotropin lub laparoskopowej diatermii jajników (ang. *laparoscopic ovarian drilling*, LOD). Laparoskopowe nakłucie jajników może prowadzić do spontanicznej ciąży lub poprawić odpowiedź na działanie doustnych leków, a w niektórych przypadkach zapewnić długotrwałą poprawę [51].

Kluczowym elementem leczenia PCOS jest redukcja insulinooporności, z uwagi na wielokierunkowe działanie nadmiaru insuliny. W tym celu pacjentkom najczęściej przepisywana jest metformina, czyli lek poprawiający insulinooporność tkanek docelowego działania insuliny [52]. Jednocześnie, rekomendowana jest odpowiednia modyfikacja trybu życia, szczególnie w przypadku otyłych pacjentek, ze względu na szkodliwy wpływ otyłości brzusznej i zwiększone ryzyko zaburzeń kardiometabolicznych [53]. Odpowiednia zmiana stylu życia pozytywnie wpływa

na poprawę profilu lipidowego, tolerancję glukozy i zwiększenie wrażliwości na insulinę a także obniżenie poziomu androgenów [54]. Pojawiają się doniesienia, iż zaburzona mikroflora jelitowa może mieć również istotne znaczenie w kontekście patofizjologii PCOS [55]. Wykazano, że włączenie odpowiedniej suplementacji probiotycznej i prebiotycznej ma korzystny wpływ na poprawę wielu wskaźników biochemicznych u kobiet z PCOS [56].

Aktualnie przyjęte strategie terapeutyczne koncentrują się przede wszystkim na łagodzeniu objawów, poprawie komfortu życia pacjentek oraz minimalizowaniu powikłań. Niestety, nadal brakuje skutecznego leczenia przyczynowego a większość wykorzystywanych leków stosowanych jest poza ich głównymi wskazaniami, co wynika głównie z potrzeby dostosowania dostępnych terapii do indywidualnych potrzeb pacjentek.

Dlatego też rozwój dalszych badań z zastosowaniem zintegrowanego podejścia obejmującego różnorodne dziedziny nauki jest niezbędny do pełnego zrozumienia pierwotnej przyczyny PCOS i opracowania dedykowanych strategii leczenia. Identyfikacja właściwych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju PCOS przyczyni się do wyznaczenia wiarygodnych wskaźników, dzięki którym możliwe będzie łatwiejsze diagnozowanie pacjentek, jeszcze przed wystąpieniem klinicznych objawów PCOS i odpowiednio wczesne wdrożenie terapii, co może mieć znaczący wpływ na poprawę komfortu i jakości życia pacjentek z PCOS.

3. Analiza metabolomiczna

Metabolom człowieka stanowią endogenne produkty szlaków metabolicznych, jak również związki egzogenne, takie jak metabolity leków, składniki żywności, czy zanieczyszczenia środowiskowe [57]. Metabolity, będące substratami i produktami złożonych przemian biochemicznych, odgrywają fundamentalną rolę w regulacji różnorodnych procesów zachodzących w organizmie, zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. Głównym celem analizy metabolomicznej jest jakościowa i ilościowa ocena związków o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 1500 Da. Do podstawowych grup metabolitów należą aminokwasy, węglowodany, kwasy tłuszczowe, nukleotydy, hormony czy witaminy. Analiza metabolomu umożliwia badanie całego spektrum tych małych cząsteczkowych związków i dostarcza cennych informacji o stanie zdrowia i funkcjonowaniu organizmu [58].

3.1 Strategie badawcze stosowane w metabolomice

W badaniach metabolomicznych wykorzystywane są różne podejścia badawcze. Jako dwie podstawowe strategie wyróżniamy niecelowaną analizę metabolomiczną (z ang. *untargeted metabolomics*), skupiającą się na ocenie jakościowej oraz identyfikacji szerokiej puli metabolitów w badanej próbce biologicznej oraz celowaną analizę metabolomiczną (z ang. *targeted metabolomics*) ukierunkowaną na ilościowe oznaczenie wybranych metabolitów [59].

W ramach analizy niecelowanej stosuje się dwa podejścia. Jednym z nich jest badanie tzw. metabolicznego odcisku palca (z ang. *metabolic fingerprinting*) polegające na analizie kompleksowego profilu endogennych metabolitów wewnątrzkomórkowych, określeniu różnic pomiędzy badanymi grupami oraz interpretacji zidentyfikowanych zmian w kontekście patofizjologii badanej jednostki chorobowej. Drugie podejście to badanie tzw. metabolicznego odcisku stopy (z ang. *metabolic footprinting*) skupiające się na analizie metabolitów, które uwalniane są z komórek lub organizmu do zewnętrznego medium. Podejście to jest często wykorzystywane w badaniach z użyciem linii komórkowych.

Oprócz opisanych powyżej strategii badawczych, w metabolomice wyróżnia się jeszcze jedno podejście - profilowanie metaboliczne (z ang. *metabolic profiling*) polegające na oznaczaniu tylko określonej grupy związków posiadających podobne właściwości fizykochemiczne bądź pochodzących z tych samych szlaków metabolicznych (np. glikoliza, cykl Krebsa). Profilowanie metaboliczne może mieć charakter zarówno jakościowy jak i ilościowy.

3.1.1 Niecelowana analiza metabolomiczna

Podstawowym założeniem niecelowanej analizy metabolomicznej jest jednoczesne oznaczenie możliwie jak największej liczby związków w badanej próbce. Strategia ta umożliwia porównanie profili metabolicznych pomiędzy badanymi grupami oraz wstępną selekcję metabolitów o największym potencjale diagnostycznym. Wyniki analiz prowadzą do sformułowania wstępnych hipotez badawczych dotyczących badanych patomechanizmów chorobowych oraz określają kierunek dalszych badań. Dlatego też bardzo istotne jest staranne opracowanie planu projektu badawczego przed przystąpieniem do oznaczeń jakościowych [60].

Pierwszym etapem badań jest dobór odpowiedniej grupy badawczej. Biorąc pod uwagę częstotliwość występowania danej jednostki chorobowej, należy oszacować liczebność grup, zarówno badawczej jak i grupy kontrolnej [61]. Kluczowym elementem jest ustanowienie odpowiednich kryteriów włączenia oraz wyłączenia z badania. Umożliwia to zminimalizowanie wpływu czynników zewnętrznych na profil metaboliczny oraz zapewnienie, iż zmiany obserwowane w metabolomie pomiędzy badanymi grupami, wynikają przede wszystkim z rozwoju danej jednostki chorobowej a nie zmienności międzyosobniczej. Najczęściej stosowanymi kryteriami podstawowymi są: wiek [62], płeć [63], wskaźnik BMI [64], choroby współistniejące [65], stosowane leki [66] oraz tryb życia [67,68]. W zależności od charakterystyki danej choroby, rozpatrywane mogą być również dodatkowe kryteria.

Istotnym elementem jest również wybór odpowiedniego materiału biologicznego. Dobór matrycy biologicznej determinowany jest przez cel badawczy. Różne matryce biologiczne mogą dostarczać unikalnych informacji, a analiza wielu matryc jednocześnie, umożliwia uzyskanie bardziej kompleksowego i specyficznego zestawu związków wchodzących w skład analizowanego profilu metabolicznego. Jako podstawowe matryce biologiczne, w badaniach metabolomicznych, wykorzystywane są płyny ustrojowe do których zaliczamy: osocze [69], surowicę krwi [70], ślinę [71], mocz [72] czy płyn mózgowo-rdzeniowy [73]. W analizie metabolomicznej wykorzystuje się również inne, mniej konwencjonalne matryce takie jak: plwocina, pot, łzy, woda kałowa, żółć, mleko matki, płyn owodniowy, nasienie i wiele innych [2]. Jednakże, z uwagi na łatwą dostępność oraz stosunkowo mało inwazyjny sposób pozyskiwania, krew i mocz znalazły szerokie zastosowanie w badaniach metabolomicznych. Obie matryce odzwierciedlają zarówno metabolom jak i zmiany zachodzące w jego obrębie [74].

Bardzo ważnym aspektem jest również właściwy pobór oraz zabezpieczenie pobranego materiału biologicznego. Stąd, w celu zapewnienia jednorodności oraz zminimalizowania zmienności mogącej wpływać na wyniki oznaczeń, opracowywane są szczegółowe procedury pobierania i przechowywania próbek [60].

Odpowiednie przygotowanie wybranej matrycy biologicznej jest kolejnym, kluczowym etapem badań metabolomicznych. Z uwagi, iż analiza niecelowana zakłada

oznaczenie możliwe jak największej liczby związków w badanej próbce, preferowane jest jej minimalne przygotowanie w celu uniknięcia potencjalnej utraty metabolitów [75]. Procedura przygotowania próbek do oznaczeń jakościowych powinna uwzględniać rodzaj wykorzystywanej matrycy i być prosta, szybka, powtarzalna, a także umożliwić izolację jak największej liczby metabolitów o odmiennych właściwościach fizykochemicznych. W przypadku matryc bogato białkowych tj. osocze, surowica czy tkanka, powinna umożliwić oddzielenie związków małocząsteczkowych od wielkocząsteczkowych np. białek, natomiast w przypadku moczu, który zawiera relatywnie małe ilości protein procedura może zostać uproszczona i obejmować jedynie odwirowanie, a następnie rozcieńczenie wodą [76]. W zależności od rodzaju matrycy biologicznej oraz wybranej techniki analitycznej procedura przygotowania próbki może obejmować także inne etapy jak: homogenizacja, odbiałczanie, konwersja chemiczna, odparowywanie do sucha, rozcieńczanie, filtrowanie, rozpuszczanie w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym.

Właściwie przygotowana próbka biologiczna jest następnie poddawana analizie z wykorzystaniem odpowiednich technik i zoptymalizowanych metod analitycznych. Podczas gdy kryteria walidacji dla oznaczeń ilościowych są jasno określone w międzynarodowych wytycznych, nie ma oficjalnych przepisów dotyczących walidacji metodologii wykorzystywanej w metabolomice niecelowanej [77,78]. W tym celu, do monitorowania jakości oznaczeń oraz powtarzalności zastosowanej metody analitycznej, wykorzystuje się próbki kontrolne (z ang. *quality control samples*, QC), które są przygotowywane i analizowane razem z próbkami rzeczywistymi [79]. Analiza odpowiedniej ilości próbek QC zapewnia kontrolę zmienności analitycznej podczas trwania oznaczeń [80]. Dodatkowo, na początku oraz na końcu analiz badane są próbki ślepe (z ang. *blank samples*), których celem jest stabilizacja sprzętu oraz weryfikacja jakości układu analitycznego [77].

Efektom prowadzonych oznaczeń jest uzyskanie danych zawierających sygnały analityczne pochodzące od setek lub nawet tysięcy analizowanych związków. Dlatego też, odpowiednie przygotowanie danych jest kluczowym elementem mającym wpływ na jakość uzyskiwanych wyników [78]. Procesowanie danych analitycznych jest zatem bardzo ważnym i długotrwałym etapem badań w ramach niecelowanej analizy metabolomicznej. Zastosowanie zaawansowanych metod chemometrycznych i statystycznych jest istotnym elementem zapewniającym odpowiednią selekcję zmiennych, a także właściwą interpretację uzyskanych wyników.

Przygotowanie danych surowych do dalszych analiz polega na poprawieniu jakości zarejestrowanych sygnałów poprzez: redukcję szumu tła, wyrównanie sygnałów, dekonwolucję, uzupełnienie brakujących wartości (z ang. *missing value*), skalowanie, normalizację oraz filtrację w oparciu o określone kryteria zapewnienia jakości (z ang. *quality assurance*, QA) [81,82]. Odpowiednio przygotowane dane analityczne są następnie poddawane jednowymiarowej oraz wielowymiarowej analizie statystycznej.

W ramach jednowymiarowej analizy statystycznej, w zależności od rozkładu zmiennych oraz ilości porównywanych grup, stosowane są odpowiednie testy statystyczne umożliwiające selekcje zmiennych istotnych statystycznie, z których najczęściej wykorzystywane są: test t-Studenta, test U Manna-Whitney'a bądź analiza wariancji ANOVA (z ang. *analysis of variance*). Dodatkowo, w celu kontroli fałszywie pozytywnych wyników stosuje się odpowiednie poprawki statystyczne np. poprawka Benjaminego-Hochberga lub Bonferroniego [83].

W ramach wielowymiarowej analizy statystycznej najczęściej wykorzystuje się: analizę składowych głównych (z ang. *principal component analysis*, PCA), analizę dyskryminacyjną cząstkowych najmniejszych kwadratów (z ang. *partial least square discriminant analysis*, PLS-DA) oraz ortogonalną analizę cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną (z ang. *orthogonal partial last squares discriminant analysis*, OPLS-DA). Analiza PCA jest metodą nienadzorowaną i umożliwia weryfikację ogólnych trendów uzyskanych danych oraz identyfikację wartości odstających. Ponadto, odpowiednie grupowanie próbek QC na modelach PCA umożliwia potwierdzenie stabilności sprzętu i powtarzalności metody w trakcie prowadzonych analiz. Dzięki temu zyskuje się pewność, iż statystycznie istotne zmiany zaobserwowane pomiędzy porównywanymi grupami odzwierciedlają rzeczywiste różnice biologiczne, a nie zmiany wynikające ze zmienności analitycznej. Z kolei analiza PLS-DA jako metoda nadzorowana umożliwia klasyfikację próbek do określonej grupy badanej na podstawie otrzymanego profilu metabolicznego. Obecnie, w metabolomice wykorzystywane są również metody uczenia maszynowego takie jak: metoda wektorów nośnych (z ang. *support vector machine*, SVM), metoda lasów losowych (z ang. *random forest*, RF) czy modele regresji logistycznej [84].

Wyselekcjonowane, w ramach analiz statystycznych, związki są następnie poddawane wstępnej identyfikacji w oparciu o czas retencji, widmo masowe, masę monoizotopową oraz rozkład izotopowy. W tym celu wykorzystywane są uniwersalne biblioteki widm np. NIST (z ang. *National Institute of Standards and Technology Library*), dostępne bazy danych, takie jak: HMDB (z ang. *Human Metabolome Database*) (www.hmdb.ca), METLIN (www.metlin.scripps.edu), KEGG (www.genome.jp/kegg), LIPIDMAPS (www.lipidmaps.org/) oraz narzędzia bioinformatyczne do wyszukiwania łączące różne bazy danych np. CEU MassMediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator>). Właściwa identyfikacja związków jest dość skomplikowanym procesem ze względu na złożoność chemiczną badanego metabolomu, dlatego też w celu potwierdzenia identyfikacji metabolitów konieczne jest porównanie widma fragmentacyjnego danego związku z widmem substancji wzorcowej [85].

Finalnym etapem badań w ramach niecelowanej analizy metabolomicznej jest interpretacja biochemiczna uzyskanych wyników. Na podstawie zidentyfikowanych metabolitów i w oparciu o dane literaturowe oraz dostępne bazy danych np. KEGG, MetaCyc (<http://metacyc.org>), BioCyc (<http://biocyc.org>) czy Metscape

(<http://metscape.ncibi.org/>) określone są szlaki metaboliczne, do których należą badane związki oraz ich rola biologiczna w kontekście patofizjologii badanej jednostki chorobowej [86].

3.1.2 Celowana analiza metabolomiczna

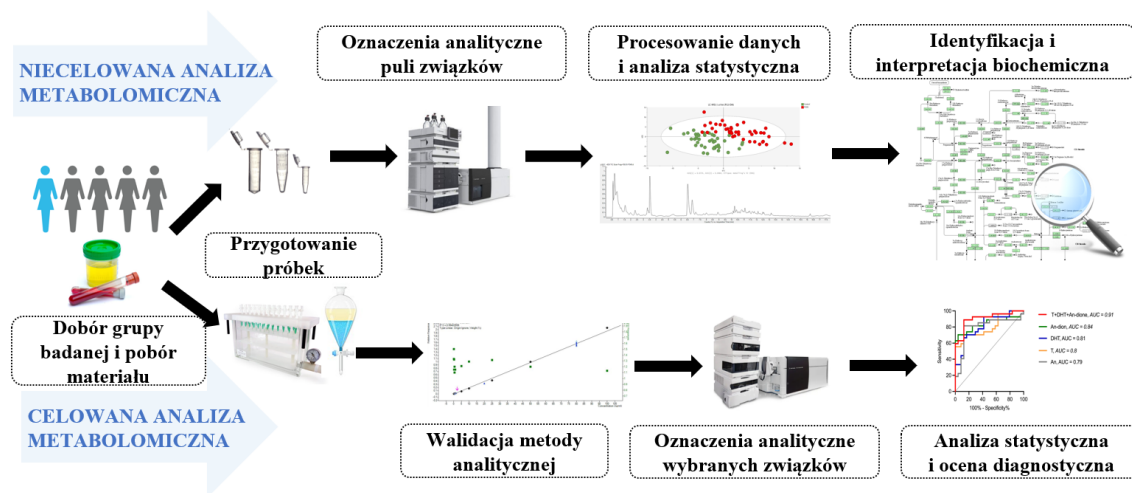
Odmienne, bardziej precyzyjnym podejściem w analizie metabolomicznej jest celowana analiza metabolomiczna. Strategia ta polega na ilościowym oznaczeniu związków bądź panelu metabolitów, które zostały wyselekcjonowane w wyniku badań jakościowych, jako potencjalne wskaźniki diagnostyczne. Podejście metabolomiki celowanej skupia się na wyznaczeniu dokładnych stężeń kilku bądź kilkunastu najistotniejszych metabolitów biorących udział w konkretnych przemianach biochemicznych, dzięki czemu możliwe jest dokładne określenie kierunku zmian zachodzących w chorobowo zmienionym szlaku metabolicznym np. na skutek zaburzonej w wyniku mutacji aktywności enzymatycznej [87], a także odnoszenie zmierzonych wartości stężeń do wyników uzyskiwanych w innych badaniach czy też do przyjętych lub znanych wartości referencyjnych

Stąd, kluczowym etapem badań w ramach celowanej analizy metabolomicznej jest etap przygotowania próbki. Wyizolowanie wybranych metabolitów spośród tysięcy innych związków obecnych w próbce jest konieczne do przeprowadzenia efektywnych oznaczeń [88]. Dlatego też, podstawowym elementem przygotowania próbki do analizy ilościowej jest ekstrakcja. Odpowiedni dobór rodzaju ekstrakcji oraz prawidłowe przeprowadzenie tego procesu ma istotny wpływ na jakość uzyskiwanych wyników. Opracowana metoda ekstrakcji powinna być więc specyficzna i dostosowana do właściwości fizykochemicznych konkretnej grupy metabolitów, stanowiących przedmiot oznaczeń. Jednocześnie procedura powinna eliminować obecność innych substancji balastowych [89]. Dzięki temu możliwe jest wyizolowanie związków występujących w bardzo niskich stężeniach, a tym samym zwiększenie czułości prowadzonych analiz [90]. Do najczęściej wykorzystywanych typów ekstrakcji w badaniach metabolomicznych należy ekstrakcja ciecz-ciecz (z ang. *liquid-liquid extraction*, LLE) oraz ekstrakcja ciecz-ciało stałe (z ang. *solid phase extraction*, SPE) [76]. Ponadto, intensywny rozwój technik mikroekstrakcji spowodował, iż stanowią one dziś atrakcyjną alternatywę dla konwencjonalnych metod z uwagi na ograniczenie zużycia rozpuszczalników, redukcję czasu ekstrakcji, niski koszt, a także zgodność z zasadami zielonej chemii [91].

Odpowiednio przygotowana próbka jest następnie poddawana oznaczeniom ilościowym za pomocą zoptymalizowanych i zwalidowanych metod analitycznych i odpowiednio dobranych technik analitycznych. Proces optymalizacji i walidacji metody analitycznej stanowi najważniejszy, a zarazem najbardziej pracochłonny etap w ramach celowanej analizy metabolomicznej. Wymagania walidacyjne stawiane ilościowym metodom analitycznym są szczegółowo opisane w ogólnodostępnych,

światowych wytycznych. Do podstawowych parametrów walidacyjnych należą: dokładność, precyzja, liniowość, limit wykrywalności, limit oznaczalności, odzysk oraz efekt matrycy [92,93].

Do określenia dokładnych stężeń analizowanych związków wykorzystuje się równania regresji wyznaczone dla krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla substancji wzorcowych. W zależności od analizowanej matrycy biologicznej, konieczne jest znormalizowanie uzyskanych wartości np. przez poziom kreatyniny bądź osmolalność w przypadku oznaczeń metabolitów wydalanych z moczem [94]. Związki różnicujące w sposób istotny statystycznie badane grupy selekcjonowane są przy użyciu analizy statystycznej. Ponadto, wykorzystywane są także narzędzia do oceny wartości diagnostycznej oznaczonych związków w kontekście przewidywania danej jednostki chorobowej np. krzywa ROC (z ang. *Receiver Operating Characteristic*). Schemat badań w ramach niecelowanej oraz celowanej analizy metabolomicznej przedstawiono na rysunku nr 2.



Rysunek 2. Schemat badań w niecelowanej i celowanej metabolomicie.

3.2 Techniki analityczne wykorzystywane w metabolomicie

Analiza profilu metabolicznego składającego się z ogromnej puli związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i szerokim zakresie stężeń, wymaga zastosowania wysoce czułych i komplementarnych technik analitycznych.

Aktualnie, najczęściej wykorzystywane jest połączenie spektrometrii mas (z ang. *mass spectrometry*, MS) z różnymi technikami separacyjnymi: chromatografią cieczową (z ang. *liquid chromatography*, LC), chromatografią gazową (z ang. *gas chromatography*, GC) oraz elektroforezą kapilarną (z ang. *capillary electrophoresis*, CE). Identyfikacja metabolitów w oparciu o parametry retencji często jest niewystarczająca w przypadku bardzo złożonych próbek biologicznych zawierających wiele związków o zbliżonych lub identycznych czasach retencji. Dlatego też, sprzężenie chromatografii ze spektrometrią mas znacznie ułatwia identyfikację, dzięki pomiarze stosunku masy do ładunku (m/z) jonów powstałych w wyniku jonizacji analizowanej próbki. Otrzymane

jony ulegają rozdzielaniu w analizatorze a zarejestrowane widmo masowe dostarcza cennych informacji na temat składu badanej próbki. Umożliwia to dokładne określenie masy, struktury oraz ilości badanych związków w matrycy biologicznej [95]. Spektrometria mas jest obecnie najbardziej czułą techniką umożliwiającą analizę związków występujących w śladowych ilościach, z bardzo dużą rozdzielczością oraz selektywnością, co czyni tę technikę unikalnym narzędziem o szerokim zastosowaniu w analizie metabolomicznej [96].

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) jest wykorzystywana do analiz licznej grupy związków, zarówno o małych masach cząsteczkowych jak również wielkocząsteczkowych polimerów, charakteryzujących się szerokim zakresem polarności. Zastosowanie metod jonizacji typu elektrorozpylanie (z ang. *electrospray ionization*, ESI) bądź laserowej jonizacji wspomaganą matrycą (z ang. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI), implikuje technikę LC-MS do analizy związków nietlonych i wrażliwych na działanie wysokiej temperatury [60]. Oznaczanie związków o zróżnicowanej polarności i odmiennych właściwościach fizykochemicznych jest możliwe dzięki stosowaniu odpowiednio modyfikowanych wypełnień kolumn i prowadzeniu procesów chromatograficznych w różnych układach faz: normalnym układzie faz (z ang. *normal phase*, NP), odwróconym układzie faz (z ang. *reversed phase*, RP) bądź zastosowaniu oddziaływań hydrofilowych (z ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC). W zależności od celu prowadzonych oznaczeń wykorzystywane są także różne rodzaje analizatorów. Do przeprowadzenia niecelowanej analizy metabolomicznej wykorzystywany jest najczęściej analizator czasu przelotu (z ang. *time-of-flight*, TOF), bądź jego połączenie z analizatorem typu kwadrupol (z ang. *quadrupole time-of-flight*, QTOF), co znacznie ułatwia identyfikację związków. Ponadto, bardzo wysoka rozdzielczość, duża szybkość skanowania oraz brak ograniczenia dotyczącego zakresu mierzonych mas, sprawia, że analizator TOF jest idealnym narzędziem to analiz jakościowych złożonych matryc biologicznych. Z kolei do oznaczeń ilościowych, z uwagi na wyższą czułość, selektywność i powtarzalność, powszechnie stosowany jest tandemowy spektrometr mas typu potrójny kwadrupol (z ang. *triple quadrupole*, QqQ). Szerokie możliwości aplikacyjne techniki LC-MS a także stosunkowo prosty etap przygotowania próbki i niewielka jej ilość wymagana do analiz, sprawiają, iż chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas jest bardzo często wykorzystywana w analizach metabolomicznych [59].

Uzupełnieniem oznaczeń wykonywanych za pomocą techniki LC-MS jest zastosowanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), która dedykowana jest analizie związków lotnych, termostabilnych oraz charakteryzujących się małą polarnością. W przypadku techniki GC-MS, najczęściej stosowaną metodą jonizacji jest jonizacja strumieniem elektronów (z ang. *electron impact ionization*, EI). Metoda ta należy do twardych metod jonizacji i charakteryzuje się wysoką powtarzalnością

fragmentacji związków, co w porównaniu do innych technik znacznie ułatwia identyfikację analitów [97]. Jednakże, w przypadku substancji polarnych i nietlotnych, w celu redukcji polarności oraz otrzymania lotnych i stabilnych termicznie pochodnych, wykonanie oznaczeń za pomocą techniki GC-MS wymaga przeprowadzenia procesu konwersji chemicznej. Proces ten niestety znacznie wydłuża etap przygotowania próbki i może być źródłem błędów analitycznych [98]. Chromatografia gazowa, podobnie jak chromatografia cieczowa jest łączona z różnymi analizatorami (TOF, QTOF, QqQ) w zależności od zakresu i celu prowadzonych analiz.

Oprócz technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas, wykorzystywana jest również elektroforeza kapilarna, dedykowana analizom polarnych oraz obdarzonych ładunkiem elektrycznym związków. Dużą zaletą techniki CE jest bardzo mała objętość wymaganej próbki (nl), bardzo niskie zużycie odczynników (ml) w porównaniu do techniki LC oraz krótki czas analizy, co idealnie wpisuje tę technikę w koncepcję zielonej chemii. Elektroforeza kapilarna charakteryzuje się bardzo dobrą rozdzielczością, ale ograniczają ją niska powtarzalność oraz brak uniwersalnych bibliotek widm. Jednakże, połączenie elektroforezy kapilarnej ze spektrometrią mas znacznie zwiększa możliwości zastosowania w analizach metabolomicznych z uwagi na wzrost czułości i specyficzności.

Drugą techniką, obok spektrometrii mas, wykorzystywaną do analiz metabolomicznych jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Umożliwia ona określenie struktury szerokiej puli związków zróżnicowanych chemicznie poprzez działanie zewnętrznego pola magnetycznego na jądra atomowe analizowanych cząsteczek. Zaletą tej techniki jest wysoka powtarzalność, łatwa identyfikacja związków oraz brak destrukcyjnego działania na analizowaną próbkę, co umożliwia ponowne jej zbadanie za pomocą innych technik. Jednakże, z uwagi na niską czułość nie może być wykorzystywana do analiz związków występujących w śladowych ilościach [99].

W badaniach metabolomicznych niekiedy stosowana jest również spektroskopia fourierowska w podczerwieni (z ang. *fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), jednakże głównie jako uzupełnienie innych technik [100].

Zintegrowana strategia łącząca zastosowanie analiz jakościowych z oznaczeniami ilościowymi a także wykorzystanie komplementarnych technik analitycznych pozwala na uzyskanie kompleksowego zestawu informacji dotyczących analizowanego profilu metabolicznego. Właściwa identyfikacja metabolitów oraz dokładne określenie ich ilości jest kluczowe do precyzyjnego określenia zmian zachodzących w badanym metabolomie oraz zrozumienia złożonych mechanizmów patofizjologicznych.

II. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena jakościowa oraz ilościowa zmian w metabolomie pacjentek z zespołem policystycznych jajników poprzez przeprowadzanie niecelowanej analizy metabolomicznej dwóch matryc biologicznych, surowicy krwi oraz moczu, a także celowanej analizy metabolomicznej hormonów steroidowych w próbkach moczu pochodzących od pacjentek z PCOS oraz zdrowych ochotniczek.

Osiągnięcie celu możliwe było poprzez realizację poniższych etapów badań:

1. Dobór odpowiedniej grupy badanej oraz kontrolnej.
2. Analiza próbek surowicy krwi oraz próbek moczu, pochodzących od pacjentek z PCOS oraz zdrowych ochotniczek, za pomocą dwóch komplementarnych technik analitycznych: wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz analizatorem czasu przelotu (HPLC-TOF/MS), a także chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas i analizatorem typu potrójny kwadrupol (GC-QqQ/MS).
3. Procesowanie danych analitycznych, jednowymiarowa i wielowymiarowa analiza statystyczna oraz identyfikacja metabolitów istotnych statystycznie.
4. Interpretacja biochemiczna uzyskanych wyników poprzez określenie szklaków biochemicznych zaburzonych w wyniku rozwoju PCOS oraz wyselekcjonowane związków w celu przeprowadzenia celowanej analizy metabolomicznej.
5. Opracowanie procedury przygotowania próbki moczu do oznaczeń ilościowych wybranych hormonów steroidowych - optymalizacja procesu hydrolizy enzymatycznej oraz izolacja związków z próbek moczu z zastosowaniem zoptymalizowanej metody cienkowsarstwowej mikroekstrakcji do fazy stałej (TF-SPME).
6. Optymalizacja i walidacja metody analitycznej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas i analizatorem typu potrójny kwadrupol (LC-QqQ/MS) w celu oznaczenia wybranych hormonów androgenowych w próbkach moczu.
7. Analiza ilościowa wybranych hormonów androgenowych w próbkach moczu pochodzących od pacjentek z PCOS oraz zdrowych ochotniczek z zastosowaniem zwalidowanej metody analitycznej.
8. Analiza statystyczna wyników uzyskanych w ramach celowanej analizy metabolomicznej oraz ocena ich potencjału diagnostycznego.

III. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Rozdział I. Zespół policystycznych jajników w ujęciu metabolomicznym

(Publikacja nr 1 - *Metabolomic insight into polycystic ovary syndrome: an overview*)

W przedstawionej publikacji dokonano przeglądu dostępnych danych literaturowych dotyczących zastosowania podejścia metabolomicznego do poszukiwania mechanizmu powstawania PCOS. Pokrótkie scharakteryzowano najczęściej stosowane techniki analityczne oraz rodzaje matryc biologicznych pozyskiwanych od pacjentek z PCOS, które wykorzystywane były do analiz jakościowych i ilościowych. Rezultaty przytoczonych prac badawczych przedstawiono w zestawieniu tabelarycznym z podziałem na rodzaj próbki biologicznej wykorzystanej do oznaczeń, zastosowanej techniki analitycznej oraz szlaku biochemicznego, do którego należą zidentyfikowane związki. Taka forma prezentacji wyników umożliwiła otrzymanie przejrzystego i kompleksowego zestawu metabolitów dotychczas raportowanych w badaniach metabolomicznych, których poziomy są istotnie zmienione w populacji kobiet z PCOS. W dalszej części pracy, dokonano weryfikacji raportowanych wyników w kontekście ich roli biologicznej oraz potencjalnego znaczenia w patomechanizmie choroby. Zauważono, iż zidentyfikowane metabolity pochodzą z różnorodnych ścieżek metabolicznych, co świadczy o złożoności zaburzeń obecnych w PCOS. Pomimo obszernych danych literaturowych, brak jest badań uwzględniających jednocześnie pobór dwóch matryc biologicznych i ich analizę za pomocą komplementarnych technik analitycznych, co zapewniłoby pełniejszą ocenę zmian metabolicznych w badanej populacji. Zwrócono również uwagę, iż kierunki zmian części raportowanych związków nie zawsze są potwierdzane przez innych badaczy, którzy z kolei obserwują odmienne zależności. Takie rozbieżności mogą wynikać z różnic w doborze grupy badawczej, przygotowaniu próbek czy sprawności zastosowanego sprzętu analitycznego. Fakt ten podkreśla, jak ważnym elementem badań metabolomicznych jest właściwe zaplanowanie oraz dokładne przeprowadzenie całego eksperymentu. Niemniej, warto zaznaczyć, iż zastosowanie podejścia metabolomicznego w obszarze PCOS cieszy się rosnącym zainteresowaniem wśród naukowców i stanowi wartościowe narzędzie do identyfikacji zaburzonych mechanizmów molekularnych oraz selekcji potencjalnych biomarkerów.

Niniejsza publikacja jest pierwszą, wysoko cytowaną (wg. bazy Scopus liczba cytowań wynosi 48) pracą przeglądową z zakresu badań metabolomicznych w obszarze PCOS, która szczegółowo podsumowuje panel najistotniejszych metabolitów zidentyfikowanych dotychczas w różnych matrycach biologicznych, przy użyciu różnych technik analitycznych. Ponadto, zwraca uwagę na rozbieżności w raportowanych danych i podkreśla aspekty badań metabolomicznych, które mają kluczowy wpływ na zapewnienie odpowiedniej jakości uzyskiwanych wyników.

Rozdział II. Niecelowana analiza metabolomiczna próbek surowicy krwi

(Publikacja nr 2 - *Identification of the metabolic fingerprints in women with polycystic ovary syndrome using the multiplatform metabolomics technique*)

Pierwszym etapem prac eksperymentalnych było przeprowadzenie niecelowanej analizy metabolomicznej próbek surowicy krwi za pomocą komplementarnych technik analitycznych.

Pacjentki włączone do badania zostały zdiagnozowane w oparciu o kryteria AES&PCOS i wykazywały kliniczne oraz biochemiczne objawy hiperandrogenizmu a także obecność policystycznych jajników stwierdzoną w badaniu ultrasonograficznym. Grupę kontrolną stanowiły kobiety dobrane pod kątem wieku oraz BMI, regularnie miesiączkujące i posiadające prawidłowe poziomy androgenów. Dokładna charakterystyka biochemiczna grupy badawczej, jak również zdefiniowane kryteria włączenia oraz wyłączenia z badania zostały przedstawione w niniejszej pracy.

Materiał biologiczny do badań pozyskano w ramach współpracy z Zakładem Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego a przeprowadzenie badań możliwe było dzięki uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (nr NKBBN/27/2018).

W celu przeprowadzenia analiz za pomocą chromatografii cieczowej, próbki surowicy poddano procesowi ekstrakcji z wykorzystaniem zimnej mieszaniny rozpuszczalników organicznych, co umożliwiło strącenie białek, odwirowaniu oraz filtracji. Analizy przeprowadzono w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem kolumny chromatograficznej Ascentis Express C18 (4,6 mm x 1500 mm, 2,7 μ m) oraz elucji gradientowej a kompozycję faz ruchomych stanowiły woda oraz acetonitryl z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego o przepływie 0,35 ml/min. Próbkę poddaną jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI) analizowano z wykorzystaniem spektrometru masowego i analizatora czasu przelotu (TOF) w trybie skanowania, w zakresie mas od 50 do 1100 m/z , w jonizacji dodatniej i ujemnej.

Przygotowanie próbek do analiz za pomocą chromatografii gazowej obejmowało odbiałczanie z wykorzystaniem zimnego rozpuszczalnika organicznego, odwirowanie a następnie przeniesienie płynu z nad osadu oraz odparowanie. Na tym etapie konieczne było przeprowadzanie konwersji chemicznej. W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję metoksymacji w celu ochrony grup funkcyjnych zawierających aktywne wodory (np. -OH, -SH, -COOH), które wykazują tendencję do tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, co z kolei negatywnie wpływa na lotność związków oraz ich stabilność termiczną. Do suchej pozostałości dodano roztwór O-metoksyminy w pirydynie a następnie próbkę poddano inkubacji w ciemności. W dalszym etapie przeprowadzono reakcję silylacji z wykorzystaniem mieszaniny N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) z trimetylochlorosilanem (TMCS).

W wyniku zastosowanej derywatywacji, otrzymano związki o zwiększonej lotności i odporności termicznej, dzięki czemu możliwe był wykonanie analiz z wykorzystaniem chromatografu gazowego. Rozdzielenie chromatograficzne przeprowadzono za pomocą kolumny kapilarnej Zebron ZB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m) i zastosowaniem gradientu temperatury oraz helu jako gazu nośnego o szybkości przepływu 10 ml/min. Próbkę poddana jonizacji strumieniem elektronów (EI) analizowana była za pomocą spektrometru masowego i analizatora typu potrójny kwadrupol (QqQ) w trybie skanowania, w zakresie masowym od 50 do 600 m/z .

Złożone sygnały analityczne, uzyskane w wyniku oznaczeń, zostały poddane procesowaniu w celu zapewnienia wysokiej jakości uzyskanych danych i otrzymania wiarygodnych wyników, co dokładnie opisano w kolejnej części pracy.

Odpowiednio przygotowaną matrycę danych poddano szczegółowej analizie statystycznej. W ramach jednowymiarowej analizy statystycznej posłużono się testem U Manna-Whitney'a oraz zastosowano poprawkę Bonferroniego. Analizę wielowymiarową rozpoczęto od przeprowadzenia analizy PCA, dzięki czemu możliwa była ocena ogólnych trendów widocznych w rozkładzie danych a także identyfikacja wyników odstających. Ponadto, posłużyła ona do potwierdzenia stabilności parametrów metody oraz powtarzalności oznaczeń. Selekcji zmiennych istotnych dokonano w ramach analizy dyskryminacyjnej PLS-DA z wykorzystywaniem współczynnika wpływu zmiennej na projekcję (z ang. *variable importance into projection*, VIP) oraz współczynnika selektywności (z ang. *selectivity ratio*, SR).

Związki wyselekcjonowane w ramach analizy statystycznej zostały poddane wstępnej identyfikacji. Metabolity oznaczone za pomocą LC-MS zidentyfikowano w oparciu o masę monoizotopową, rozkład izotopowy, czas retencji i wzór sumaryczny oraz posługując się dostępnymi bazami danych (CEU MassMediator, HMDB, KEGG, LIPIDMAPS). W przypadku związków uzyskanych za pomocą oznaczeń GC-MS, posłużono się uniwersalną biblioteką widm NIST 11, co znacznie ułatwiło i przyspieszyło proces identyfikacji.

Wynikiem przeprowadzonych oznaczeń było zidentyfikowanie kilkunastu związków, które najsilniej różnicowały badane grupy. Znalazły się wśród nich aminokwasy tj. fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan oraz treonina a także kwas moczowy, kwas mlekowy, cholesterol, siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEA-S), sfinganina oraz kilka związków z grupy lizofosfatydylocholin (z ang. *lysophosphatidylcholine*, LPC) tj. LysoPC (16:0), LysoPC (18:1), LysoPC (20:5), LysoPC (18:2).

Rozdział III. Walidacja metabolitów wyselekcjonowanych w próbkach surowicy krwi oraz niecelowana analiza metabolomiczna próbek moczu

(Publikacja nr 3 - *Searching for the primary metabolic alterations of polycystic ovary syndrome by application of the untargeted metabolomics approach*)

W kolejnym kroku, przeprowadzono weryfikację otrzymanych wyników poprzez wykonanie analogicznych analiz z wykorzystaniem nowego zestawu próbek surowicy krwi pochodzących od pacjentek z PCOS, z zachowaniem analogicznych kryteriów włączenia i wyłączenia pacjentek do badania. Cały eksperyment został wykonany w sposób analogiczny, w tym samym laboratorium, z zastosowaniem identycznej procedury przygotowania próbek, wykorzystaniem tych samych technik analitycznych oraz tożsamego podejścia do analizy danych. W wyniku przeprowadzonej walidacji klinicznej potwierdzono część wyselekcjonowanych wcześniej związków jak również zidentyfikowano nowe, istotnie statystycznie metabolity, co podsumowano w niniejszej pracy.

Celem następnego etapu pracy było przeprowadzenie niecelowanej analizy metabolomicznej drugiej matrycy biologicznej. W tym celu, próbki moczu zostały pobrane od tej samej grupy kobiet, od których pobierano próbki krwi. Materiał biologiczny pobierano pomiędzy 6 a 10 dniem cyklu, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C .

Przed przystąpieniem do oznaczeń za pomocą LC-MS próbki moczu zostały rozmrożone, rozcieńczone wodą dejonizowaną i przefiltrowane. Rozdzielenie chromatograficzne prowadzono w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem kolumny Zorbax SB C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm) oraz elucji gradientowej i przepływie 0,35 ml/min z wykorzystaniem tej samej kompozycji faz ruchomych jak w przypadku analiz surowicy. Zjonizowaną próbkę analizowano za pomocą analizatora TOF w trybie skanowania, w zakresie od 50 do 1100 m/z , w jonizacji dodatniej i ujemnej.

W celu wykonania analiz za pomocą GC-MS, przygotowanie próbek moczu rozpoczęto od inkubacji z dodatkiem ureazy. Dzięki temu możliwe było rozłożenie mocznika, którego obecność w próbce wpływa negatywnie na jakość oznaczeń. Za pomocą zimnego rozpuszczalnika dokonano odbiłączenia a supernatant, po odwirowaniu próbki, przeniesiono oraz odparowano do sucha. W kolejnym kroku, analogicznie jak dla próbek surowicy, przeprowadzono proces upochadniania próbki, po czym przystąpiono do analiz z wykorzystaniem kolumny Zebron ZB-5MS (30 m x 0,25mm, 0,25 μm) i zastosowaniem gradientu temperatury oraz helu jako gazu nośnego o szybkości przepływu 10 ml/min. Próbkę poddaną jonizacji analizowano z wykorzystaniem analizatora QqQ w trybie skanowania, w zakresie mas od 50 do 600 m/z .

W dalszej części pracy szczegółowo opisano procesowanie uzyskanych danych analitycznych oraz metodologię wykorzystaną w ramach jedno- i wielowymiarowej

analizy statystycznej. Identyfikację związków przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku oznaczeń surowicy a tożsamość związków wyselekcjonowanych z wyniku oznaczeń LC-MS została dodatkowo potwierdzona przy użyciu hybrydowego spektrometru masowego TripleTOF (z ang. *triple quadrupole time-of-flight*) i zastosowaniu biblioteki widm NIST 17, co zwiększyło pewność identyfikacji.

Poniższa praca, jako pierwsza w obszarze PCOS, skupia się na jednoczesnej analizie metabolomicznej dwóch matryc biologicznych (surowicy i moczu) z zastosowaniem komplementarnych technik analitycznych. Dzięki takiemu podejściu możliwe było wyselekcjonowanie kompleksowego panelu metabolitów oraz zidentyfikowanie najważniejszych szlaków metabolicznych zaburzonych na skutek rozwoju PCOS, co zostało podsumowane w tabeli nr 3.

Finalnym etapem oznaczeń ilościowych była interpretacja biochemiczna wytypowanych związków i ocena ich roli w kontekście patofizjologii PCOS.

Tabela 3. Metaboliczny odcisk palca pacjentek z zespołem policystycznych jajników.

Szlak biochemiczny	Metabolit	Technika analityczna	Kierunek zmian PCOS	Matryca biologiczna
Metabolizm androgenów	Siarczan dehydroepiandrosteronu	LC-MS (-)	1.3 ↑	surowica
	Siarczan dihydrotestosteronu	LC-MS (-)	1.7 ↑	surowica
	Glukuronid testosteronu	LC-MS (-)	1.3 ↑	mocz
	Glukuronid androsteronu	LC-MS (-)	1.6 ↑	mocz
	Pregnenolon	LC-MS (+)	1.5 ↑	mocz
Metabolizm fosfolipidów	Cholesterol	GC-MS	0.9 ↓	surowica
	PS(O-18:0), LysoPE(18:0), LPC(14:0)	LC-MS (+)	0.8 ↓	surowica
	LysoPS (21:0)	LC-MS (-)	0.7 ↓	surowica
	LysoPC(18:1), LysoPC(16:0), LysoPC(20:3), LysoPC(18:2)	LC-MS (+)	0.9 ↓	surowica
	LysoPC(20:4), LysoPC(20:5), PE(19:0)	LC-MS (+)	0.9 ↓	surowica
Metabolizm sfingolipidów	LPC(14:0)	LC-MS (+)	0.8 ↓	surowica
	Sfinganina	LC-MS (+)	0.7 ↓	surowica/mocz
Cykl Krebsa	Fitosfingozyna	LC-MS (+)	0.6 ↓	surowica
	Kwas α -ketoglutazarowy	LC-MS (-)	0.9 ↓	mocz
	Kwas pirogronowy	LC-MS (-)	1.3 ↑	mocz
Metabolizm glutationu	Kwas cytrynowy	LC-MS (-)	0.9 ↓	mocz
	Kwas piroglutaminowy	LC-MS (+)	0.9 ↓	mocz
Metabolizm witaminy B	Kwas pantotenowy	LC-MS (+)	0.6 ↓	mocz
	Kwas 4-pirydoksynowy	LC-MS (-)	0.7 ↓	mocz
	Ryboflawina	LC-MS (+)	0.4 ↓	mocz
Metabolizm tryptofanu	Siarczan indoksyli	LC-MS (-)	0.7 ↓	surowica
	Tryptofan	LC-MS (+)	0.9 ↓	surowica
	Kwas indolakrylowy	LC-MS (+)	1.4 ↑	mocz

	Fenyloalanina	GC-MS/ LC-MS (+)	1.3 ↑/0.9 ↓	surowica
Metabolizm fenyloalaniny	Fenyloacetyloglutamina	LC-MS (+)	0.8 ↓	mocz
	Glutamina	LC-MS (+)	0.8 ↓	mocz
	Kwas hipurowy	LC-MS (+)	0.8 ↓	mocz
Metabolizm histydyny	Kwas urokainowy	LC-MS (+)	0.9 ↓	mocz
	Kwas asparaginowy	GC-MS	1.7 ↑	surowica
	Leucyna	LC-MS (+)	0.9 ↓	surowica
	Alanina	GC-MS	1.3 ↑	mocz
Metabolizm kwasów tłuszczowych	1,3,7-oktanotriol	LC-MS (+)	0.9 ↓	surowica
	DG(17:0/PGE2/0:0)	LC-MS (+)	0.8 ↓	surowica
	Kwas glutakonowy	LC-MS (-)	1.4 ↑	mocz
	Kwas 3-hydroksyglutarowy	LC-MS (-)	0.8 ↓	mocz
	2-oktenoilokarnityna	LC-MS (+)	0.9 ↓	mocz
	Kwas propanowy	GC-MS	1.3 ↑	mocz
Metabolizm węglowodanów	1,5-Anhydrosorbitol	GC-MS	2.2 ↑	mocz
	N-acetylo-D-glukozamina	GC-MS	1.3 ↑	mocz
	Fruktoza	GC-MS	1.5 ↑	mocz
	Kwas treonowy	GC-MS	0.7 ↓ 1.5 ↑	surowica mocz
	Kwas glikocholowy	GC-MS	1.2 ↑	surowica
	Glicerol	GC-MS	1.5 ↑	mocz

Rozdział IV. Celowana analiza metabolomiczna wybranych hormonów steroidowych w próbkach moczu

(Publikacja nr 4 - *Determination of urinary androgens in women with polycystic ovary syndrome using LC-QqQ/MS and application of thin film solid phase microextraction (TF-SPME)*) - w recenzji

Spośród związków zidentyfikowanych w ramach niecelowanych analiz metabolomicznych, grupę metabolitów najwyraźniej zmienionych u kobiet z PCOS stanowiły hormony steroidowe. Z uwagi, iż poziom androgenów jest podstawowym kryterium diagnostycznym, a stosowane w tym celu komercyjnie dostępne metody mogą być niewystarczające, celem niniejszej pracy było profilowanie hormonów steroidowych w próbkach biologicznych. W ramach niniejszej pracy oznaczono ilościowo wyselekcjonowane androgeny celem sprawdzenia ich potencjału diagnostycznego w PCOS.

Badania poziomu hormonów wykonywane są głównie w próbkach surowicy, jednakże, okazuje się, że analiza surowicy, za pomocą metod immunochemicznych, nie pozwala na wiarygodne wykrycie biochemicznego hiperandrogenizmu u 20–40% kobiet z PCOS [101]. Ponadto, stężenie androgenów w surowicy może być mylące ze względu na wahania spowodowane rytmem dobowym. Stąd, wykorzystanie do oznaczeń próbek moczu może służyć jako wiarygodny wskaźnik produkcji androgenów, w którym poziom hormonów pozostaje w dużej mierze nienaruszony fluktuacjami obecnymi we krwi [102].

W ramach niniejszej pracy została opracowana i zwalidowana innowacyjna metoda analityczna umożliwiająca szybkie oznaczenie kilku hormonów androgenowych z wymaganą czułością, selektywnością i dokładnością.

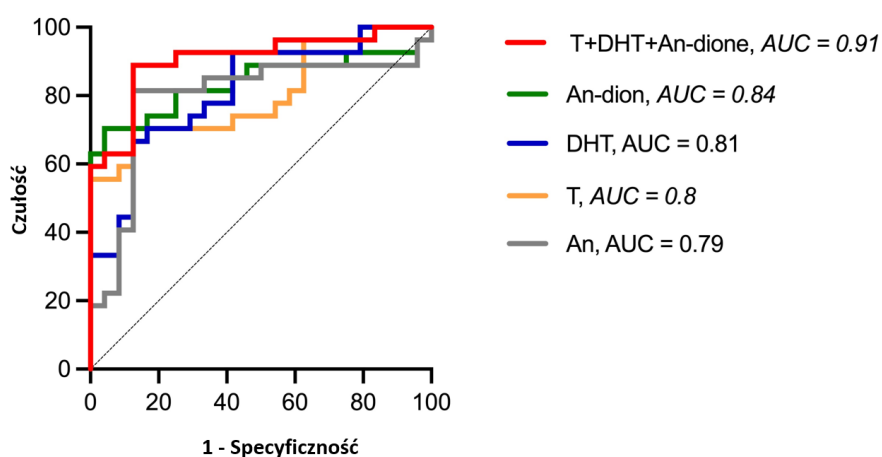
Z uwagi, iż hormony steroidowe wydalane są z moczem w postaci form skoniugowanych, jako pochodne glukuronidowe oraz w postaci siarczanów, pierwszym etapem przygotowania próbek do analiz było przeprowadzenie procesu hydrolizy enzymatycznej z wykorzystaniem β -glukuronidazy, celem otrzymania wolnej frakcji hormonów. Następnie, próbki moczu zostały poddane procesowi ekstrakcji z wykorzystaniem cienkwarstwowej mikroekstrakcji do fazy stałej (z ang. *thin film solid phase microextraction*, TF-SPME). Zastosowanie tego typu ekstrakcji pozwoliło uprościć i zautomatyzować proces przygotowania próbki, jak również zminimalizować ewentualne błędy, zanieczyszczenie próbki a także ograniczyć zużycie rozpuszczalników. Ponadto, ten typ ekstrakcji został wykorzystany po raz pierwszy w obszarze badań dotyczących oznaczeń hormonalnych u kobiet z POCS. Proces ekstrakcji został przeprowadzony w oparciu o zoptymalizowaną wcześniej procedurę [103].

Przed przystąpieniem do oznaczeń konieczne było przeprowadzenie procesu optymalizacji oraz walidacji metody analitycznej, co szczegółowo opisano w niniejszej

pracy. Oznaczenia ilościowe czterech hormonów steroidowych (androstenedionu, testosteronu, 5 α -dihydrotestosteronu i androsteronu) zostały wykonane w próbkach moczu z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz analizatorem typu potrójny kwadrupol (LC-QqQ/MS). Rozdzielenie chromatograficzne zostało przeprowadzane z użyciem kolumny ZORBAX Extend C18 (2,1 mm x 100 mm, 3,5 μ m). Fazy ruchome użyte do analiz składały się z 0,1% roztworów kwasu mrówkowego w wodzie i w metanolu a zastosowana szybkość przepływu wynosiła 0,35 ml/min. Dzięki zastosowaniu elucji izokratycznej, przy zachowaniu jednocześnie wystarczającego rozdzielania, czas trwania analiz został maksymalnie skrócony i wynosił 7 min. Zjonizowana w źródle ESI próbka analizowana była w analizatorze QqQ w trybie bezpośredniego monitorowania reakcji wielokrotnych (z ang. *direct multiple reactions monitoring*, dMRM).

Wyniki oznaczeń wskazują, iż poziom wszystkich zmierzonych androgenów: androstenedionu (AN-DIONE), testosteronu (T), 5 α -dihydrotestosteronu (DHT) i androsteronu (AN) był wyższy u pacjentek z PCOS około 2-3 krotnie w porównaniu do zdrowych kobiet, a największe różnice w średniej zawartości zaobserwowano dla 5 α -dihydrotestosteronu.

Poszukując najlepszego wskaźnika steroidowego PCOS, oceniono wartość predykcyjną mierzonych związków za pomocą analizy ROC (Rys. 3) i zaobserwowano, że AN-DIONE był najlepszym pojedynczym klasyfikatorem PCOS (AUC = 0,84). Zauważono jednak, iż badanie trzech androgenów łącznie: T+DHT+DIONE okazuje się być zdecydowanie jeszcze lepszym markerem predykcyjnym (AUC = 0,91) (95% CI: 0,8212–0,9905).



Rysunek 3. Analiza ROC wykonana dla oznaczonych hormonów androgenowych.

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Nadrzędnym celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena zmian w metabolomie pacjentek z zespołem policystycznych jajników, a także próba wyjaśnienia mechanizmu odpowiedzialnego za rozwój hiperandrogenizmu oraz innych zaburzeń metabolicznych przy użyciu analizy metabolomicznej. W przedstawionych publikacjach naukowych zaprezentowano i omówiono poszczególne etapy realizacji pracy doktorskiej, które opierały się na wykorzystaniu zintegrowanego podejścia metabolomicznego.

Przeprowadzenie niecelowanej analizy metabolomicznej dwóch matryc biologicznych z wykorzystaniem komplementarnych technik analitycznych, umożliwiło detekcję szerokiego spektrum związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i otrzymanie kompleksowego panelu metabolitów o istotnym znaczeniu w patomechanizmie PCOS. Dzięki temu podejściu, zidentyfikowano najważniejsze szlaki biochemiczne zaburzone na skutek rozwoju choroby, do których zaliczyć można przede wszystkim metabolizm hormonów steroidowych, metabolizm sfingo- i fosfolipidów oraz przemiany kwasów tłuszczowych. Ponadto zaobserwowano zmiany w metabolizmie węglowodanów, w tym dość znacząco w cyklu Krebsa, metabolizmie witaminy B, cyklu γ -glutamylowym i kilku głównych aminokwasach tj. tryptofanu, fenyloalaniny, histydyny i alaniny.

Zauważono, iż większość zaburzeń metabolicznych u kobiet z PCOS, zidentyfikowanych w niniejszym badaniu, ma związek z działaniem insuliny. Biorąc pod uwagę plejotropowe działanie insuliny oraz fakt, że insulinooporność jest rozpoznawana u znacznej większości kobiet z PCOS, wyniki przeprowadzonych badań mogą wskazywać na insulinozależny model patofizjologiczny, jako potencjalnie pierwotny mechanizm rozwoju PCOS. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi, gdzie opisywane są zaburzenia sygnalizacji insulinowej u kobiet z PCOS oraz podwyższone stężenie insuliny jako czynnik sprawczy rozwoju wielu zaburzeń metabolicznych. [104,105,106]. Tę cenną obserwację należy poddać dalszej ocenie i potwierdzić w przyszłych pracach badawczych.

Przeprowadzenie celowanej analizy metabolomicznej wyselekcjonowanych hormonów androgenowych pozwoliło na zmierzenie ich poziomu w próbkach moczu z wymaganą dokładnością i specyficznością. Dzięki temu, możliwe było zweryfikowanie potencjału diagnostycznego tych związków w kontekście aktualnie przyjętych kryteriów i pojawiających się wątpliwości związanych z wiarygodnością komercyjnie prowadzonych pomiarów. Wyniki oznaczeń ilościowych wskazały, iż badanie panelu androgenów tj. testosteron, 5α -dihydrotestosteron oraz androstenedion jest znacznie lepszym wskaźnikiem prognostycznym PCOS niż pomiar poszczególnych hormonów pojedynczo, bądź w innych konfiguracjach i wykazuje bardzo wysoki procent poprawności predykcji. Z uwagi, iż badania ilościowe prowadzone były dla czterech głównych androgenów, wartościowym będzie rozszerzenie opracowanej metody

o dodatkowe związki pochodzące ze szlaku przemian steroidowych i zweryfikowanie, czy mogą one wnieść wartość dodaną w kwestii zdolności predykcyjnej zaproponowanego zestawu androgenów. Niemniej, warto zaznaczyć, iż analizowane związki zostały wyselekcjonowane w ramach niecelowanych analiz metabolomicznych jako te o największym potencjale dyskryminacyjnym, stąd też ich znaczenie w kontekście diagnozy PCOS wydaje się być najbardziej istotne.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwalają na sformułowanie poniższych wniosków:

- ✓ Wyniki przeprowadzonych oznaczeń potwierdzają zasadność wykorzystywania łączonych matryc biologicznych (surowica, mocz) oraz stosowania komplementarnych technik analitycznych (LC-MS, GC-MS) w ramach niecelowanych analiz metabolomicznych, co umożliwia oznaczenie kompleksowego zestawu metabolitów istotnie zmienionych u pacjentek z PCOS.
- ✓ Niecelowana analiza metabolomiczna jest użytecznym narzędziem do oceny zmian w badanym metabolomie, dzięki której możliwa była identyfikacja szlaków biochemicznych zaburzonych na skutek rozwoju PCOS a także wytypowanie jednego z trzech proponowanych obecnie modeli patofizjologicznych, jako potencjalnie pierwotnej przyczyny rozwoju PCOS.
- ✓ Opracowana i zwalidowana metoda analityczna, łącząca wykorzystanie innowacyjnej metody ekstrakcji oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, umożliwiła przeprowadzenie szybkiej i dokładnej oceny ilościowej czterech wytypowanych związków w ramach jednej analizy, a otrzymane wyniki pozwoliły zaproponować panel potencjalnych wskaźników diagnostycznych.
- ✓ Wyniki celowanej analizy metabolomicznej potwierdzają, iż poszukiwanie biomarkerów w badaniach metabolomicznych powinno skupiać się na identyfikacji panelu związków (tzw. panelu biomarkerów), co może znacząco poprawić precyzję i wiarygodność diagnostyki w porównaniu do monitorowania tylko pojedynczych metabolitów.
- ✓ Zintegrowana strategia łącząca zastosowanie analiz jakościowych z oznaczeniami ilościowymi pozwala na uzyskanie pełnego obrazu zmian w badanym metabolomie i wiarygodną identyfikację potencjalnych biomarkerów w oparciu o dokładnie zmierzone poziomy stężeń.
- ✓ Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie interesujących hipotez oraz wyznaczenie kierunku dalszych badań, które mogą mieć istotne znaczenie w wyjaśnieniu patomechanizmu PCOS i udoskonaleniu metod diagnostycznych.

V. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Słowikowska, B. Toczyłowska, R. Cichoń, P. Hendzel, Metabolomics - the chemical „fingerprint” and important element of personalized medicine, *Folia Cardiol.*, 11 (2016) 353–358, doi: 10.5603/fc.2016.0060.
- [2] V. Gonzalez-Covarrubias, E. Martínez-Martínez, L. Del Bosque-Plata, The Potential of Metabolomics in Biomedical Applications, *Metabolites*, 12 (2022) 194, doi: 10.3390/metabo12020194.
- [3] T. Bracewell-Milnes, S. Saso, H. Abdalla, D. Nikolau, J. Norman-Taylor, M. Johnson, E. Holmes, M. Y. Thum, Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: A systematic review, *Hum. Reprod. Update*, 23 (2017) 723–736, doi: 10.1093/humupd/dmx023.
- [4] S. Bednarska, A. Siejka, The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What’s new?, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 26 (2017) 359–367, doi: 10.17219/acem/59380.
- [5] H. F. Escobar- Morreale, Polycystic ovary syndrome : definition, aetiology, diagnosis and treatment, 14 (2018) 270-284, doi: 10.1038/nrendo.2018.24.
- [6] Y. M. Jeanes, S. Reeves, Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: Diagnostic and methodological challenges, *Nutr. Res. Rev.*, 30 (2017) 97–105, doi: 0.1017/S0954422416000287.
- [7] R. A. Wild, E. Carmina, E. Diamanti-Kandarakis, A. Dokras, H. F. Escobar-Morreale, W. Futterweit, R. Lobo, R. J. Norman, E. Talbott, D. A. Dumesic, Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: A consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome (AE-PCOS) society, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95 (2010) 2038–2049, doi: 10.1210/jc.2009-2724.
- [8] R. Azziz, E. Carmina, D. Dewailly, E. Diamanti-Kandarakis, H. F. Escobar-Morreale, W. Futterweit, O. E. Janssen, R. S. Legro, R. J. Norman, A. E. Taylor, S. F. Witchel, The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome : the complete task force report, *Fertil Steril.* 91 (2009) 456-488, doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.06.035
- [9] H. Nautiyal, S.S. Imam, S. Alshehri, M. M. Ghoneim, M. Afzal, S. I. Alzarea, E. Güven, F. A. Al-Abbasi, I. Kazmi, Polycystic Ovarian Syndrome: A Complex Disease with a Genetics Approach, *Biomedicines*, 10 (2022) 1–26, 2022, doi: 10.3390/biomedicines10030540.
- [10] Y. Che, J. Yu, Y. S. Li, Y. C. Zhu, T. Tao, Polycystic Ovary Syndrome: Challenges and Possible Solutions, *J. Clin. Med.*, 12 (2023) 1500, doi: 10.3390/jcm12041500.
- [11] D. Radomski, A. Orzechowska, E. Barcz, Present conceptions of etiopathogenesis of polycystic ovary syndrome, *Ginekol Pol*, 78 (2007) 393–399

- [12] R. Azziz, E. Carmina, Z. Chen, A. Dunaif, J.S. Laven, R.S. Legro, D. Lizneva, B. Natterson-Horowitz, H.J. Teede, B.O. Yildiz, Polycystic ovary syndrome, *Obs. Gynecol.*, 132 (2018) 321–336, doi: 10.1038/nrdp.2016.57.
- [13] C. M. Burt Solorzano, C. R. McCartney, S. K. Blank, K. L. Knudsen, J. C. Marshall, Hyperandrogenaemia in adolescent girls: Origins of abnormal gonadotropin-releasing hormone secretion, *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, 117 (2010) 143–149, doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02383.x.
- [14] J. Qiao, H. L. Feng, Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: Impact on oocyte maturation and embryo developmental competence, *Hum. Reprod. Update*, 17 (2011) 17–33, doi: 10.1093/humupd/dmq032.
- [15] J. S. E. Laven, A. G. M. G. J. Mulders, J. A. Visser, A. P. Themmen, F. H. De Jong, B. C. J. M. Fauser, Anti-Müllerian Hormone Serum Concentrations in Normoovulatory and Anovulatory Women of Reproductive Age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 318–323, doi: 10.1210/jc.2003-030932.
- [16] F. J. Broekmans, J. A. Visser, J. S. E. Laven, S. L. Broer, A. P. N. Themmen, B. C. Fauser, Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction, *Trends Endocrinol. Metab.* 19 (2008) 340–347, doi: 10.1016/j.tem.2008.08.002.
- [17] R. Azziz, E. Carmina, Z. Chen, A. Dunaif, J. S. E. Laven, and B. O. Y. R. S. Legro, D. Lizneva, B. Natterson-Horowitz, H. J. Teede, Polycystic ovary syndrome, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 11 (2016) 16057, doi: 10.1038/nrdp.2016.57
- [18] I. Munir, Y. Hui-Wen Yen, D. H. Geller, D. Torbati, R. M. Bierden, S. R. Weitsman, S. K. Agarwal, D. A. Magoffin, Insulin Augmentation of 17 α -Hydroxylase Activity Is Mediated by Phosphatidyl Inositol 3-Kinase but Not Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/ 2 in Human Ovarian Theca Cells, *Endocrinology*, 145 (2004) 175–183, doi: 10.1210/en.2003-0329.
- [19] J. E. Nestler, L. P. Powers, D. W. Matt, K. A. Steingold, S. R. Plymate, R. S. Rittmaster, J. N. Clore, W. G. Blackard, A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72 (1991) 83–89, doi: 0.1210/jcem-72-1-83.
- [20] Y. H. Chen, S. Heneidi, J.M. Lee, L.C Layman, D.W Stepp, G.M. Gamboa, B.S. Chen, G. Chazenbalk, R. Azziz, Mirna-93 inhibits glut4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance, *Diabetes*, 62 (2013) 2278–2286, doi: 10.2337/db12-0963.
- [21] G. Chazenbalk, B. S Trivax, B. O. Yildiz, C. Bertolotto, R. Mathur, S. Heneidi, R. Azziz, Regulation of adiponectin secretion by adipocytes in the polycystic ovary syndrome: Role of tumor necrosis factor- α , *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95 (2010) 935–942, doi: 10.1210/jc.2009-1158.
- [22] K. Mykhalchenko, D. Lizneva, T. Trofimova, W. Walker, L. Suturina, M.P. Diamond, R. Azziz, Genetics of polycystic ovary syndrome, *Expert Rev. Mol.*

- Diagn. 17 (2017) 723–733, doi: 10.1080/14737159.2017.1340833.
- [23] R. Azziz, PCOS in 2015: New insights into the genetics of polycystic ovary syndrome, *Nat. Rev. Endocrinol.*, 12 (2016) 74–75, doi: 0.1038/nrendo.2015.230.
- [24] J. P. Christ, M. I. Cedars, Current Guidelines for Diagnosing PCOS, *Diagnostics*, 13 (2023), 1113, doi: 10.3390/diagnostics13061113.
- [25] G. Bozdag, S. Mumusoglu, D. Zengin, E. Karabulut, B. O. Yildiz, The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-Analysis, *Hum. Reprod.*, 31 (2016) 2841–2855, doi: 10.1093/humrep/dew218.
- [26] D. Lizneva, L. Suturina, W. Walker, S. Brakta, L. Gavrilova-Jordan, R. Azziz, Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome, *Fertil. Steril.*, 106 (2016) 6–15, doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.05.003.
- [27] S. Sahmay, N. Atakul, M. Oncul, A. Tuten, B. Aydogan, H. Seyisoglu, Serum anti-mullerian hormone levels in the main phenotypes of polycystic ovary syndrome, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 170 (2013) 157–161, doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.019.
- [28] E. Carmina, M. C. Chu, R. A. Longo, G. B. Rini, R. A. Lobo, Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90 (2005) 2545–2549, doi: 10.1210/jc.2004-2279.
- [29] H. Y. Zhang, F. F. Zhu, J. Xiong, X. B. Shi, S. X. Fu, Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome based on the Rotterdam criteria in a large-scale Chinese population, *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, 116 (2009) 1633–1639, 2009, doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02347.x.
- [30] S. Sobti, R. Dewan, S. Ranga, Metabolic syndrome and insulin resistance in PCOS phenotypes, *Int. J. Reprod. Contraception, Obstet. Gynecol.*, 6 (2017) 5067–5073, doi: 10.18203/2320-1770.ijrcog20175027.
- [31] H. F. Escobar-Morreale, E. Carmina, D. Dewailly, A. Gambineri, F. Kelestimur, P. Moghetti, M. Pugeat, J. Qiao, C. N. Wijeyaratne, S. F. Witchel, R. J. Norman, Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: A consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome society, *Hum. Reprod. Update*, 18 (2012) 146–170, doi: 10.1093/humupd/dmr042.
- [32] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome, *Hum. Reprod.*, 19 (2004) 41–47, doi: 10.1093/humrep/deh098.
- [33] B. O. Yildiz, S. Bolour, K. Woods, A. Moore, R. Azziz, Visually scoring hirsutism, *Hum. Reprod. Update*, 16 (2009) 51–64, doi: 0.1093/humupd/dmp024.

- [34] A. E. Joham, T. Piltonen, M. E. Lujan, S. Kiconco, C. T. Tay, Challenges in diagnosis and understanding of natural history of polycystic ovary syndrome, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 97 (2022) 165–173, 2022, doi: 10.1111/cen.14757.
- [35] S. A. Wudy, M. F. Hartmann, Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology, *Horm. Metab. Res.* 36 (2004) 415–422, doi: 10.1055/s-2004-814565.
- [36] W. Rosner, R. J. Auchus, R. Azziz, P. M. Sluss, H. Raff, Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: An endocrine society position statement, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92 (2007) 405–413, doi: 10.1210/jc.2006-1864.
- [37] N. F. Goodman, R. H. Cobin, W. Futterweit, J. S. Glueck, R. S. Legro, and E. Carmina, American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), American College of Endocrinology (ACE), and Androgen Excess and PCOS Society (AES), Guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome - Part 1, *Endocr. Pract.*, 21 (2015) 1291–1300, doi: 10.4158/EP15748.DSC.
- [38] J. C. Prior, M. Naess, A. Langhammer, S. Forsmo, Ovulation prevalence in women with spontaneous normal-length menstrual cycles - A population-based cohort from HUNT3, Norway, *PLoS One*, 10 (2015) 1–14, doi: 10.1371/journal.pone.0134473.
- [39] H. J. Teede, M. L. Misso, M.F. Costello, A. Dokras, J. Laven, L. Moran, T. Piltonen, R. J. Norman, International PCOS Network, Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome, *Hum. Reprod.*, 33 (2018) 1602–1618, doi: 10.1093/humrep/dey256.
- [40] D. Dewailly, M. E. Lujan, E. Carmina, M. I. Cedars, J. L., R. J. Norman, H. F. Escobar-Morreale, Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the androgen excess and polycystic ovary syndrome society, *Hum. Reprod. Update*, 20 (2014) 334–352, doi: 0.1093/humupd/dmt061.
- [41] S. F. Witchel, S. Oberfield, R. L. Rosenfield, E. Codner, A. Bonny, L. Ibáñez, A. Pena, R. Horikawa, V. Gomez-Lobo, D. Joel, H. Tfayli, S. Arslanian, P. Dabadghao, C. G. Rudaz, P. A. Lee., The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence, *Horm. Res. Paediatr.*, 83 (2015) 376–389, doi: 10.1159/000375530.
- [42] M. K. Kamboj, A. E. Bonny, Polycystic ovary syndrome in adolescence: Diagnostic and therapeutic strategies, *Transl. Pediatr.*, 6 (2017) 248–255, doi: 10.21037/tp.2017.09.11.
- [43] R. S. Legro, S. A. Arslanian, D. A. Ehrmann, K. M. Hoeger, M. H. Murad, R. Pasquali, C. K. Welt, Endocrine Society, Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An endocrine society clinical practice guideline, *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab., 98 (2013) 4565–4592, doi: 10.1210/jc.2013-2350.
- [44] B. O. Yildiz, Assessment, diagnosis and treatment of a patient with hirsutism, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 4 (2008) 294–300, doi: 10.1038/ncpendmet0789.
- [45] B. O. Yildiz, Approach to the patient: contraception in women with polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 100 (2015) 794–802, doi: 10.1210/jc.2014-3196.
- [46] O. Koulouri, G. S. Conway, A systematic review of commonly used medical treatments for hirsutism in women, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., 68, (2008) 800–805, doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.03105.x.
- [47] J. Leyden, L. Stein-Gold, J. Weiss, Why Topical Retinoids Are Mainstay of Therapy for Acne, *Dermatol. Ther. (Heidelb)*., 7 (2017) 293–304, doi: 10.1007/s13555-017-0185-2.
- [48] E. J. Van Zuuren, Z. Fedorowicz, Interventions for female pattern hair loss, *JAMA Dermatology*, 153 (2017) 329–330, doi: 0.1001/jamadermatol.2016.5790.
- [49] R. S. Legro, Ovulation induction in polycystic ovary syndrome: Current options, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 37 (2016) 152–159, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.001.
- [50] R. Azziz et al., “Polycystic ovary syndrome,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.57.
- [51] C. Farquhar, J. Brown, J. Marjoribanks, Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 6 (2012), CD001122, doi: 10.1002/14651858.CD001122.pub4.
- [52] N. Naderpoor, S. Shorakae, B. De Courten, M. L. Misso, L. J. Moran, H. J. Teede, Metformin and lifestyle modification in polycysticovary syndrome: Systematic review and meta-analysis, *Hum. Reprod. Update*, 21 (2015) 560–574, doi: 10.1093/humupd/dmv025.
- [53] G. Conway, D. Dewailly, E. Diamanti-Kandarakis, H. F. Escobar-Morreale, S. Franks, A. Gambineri, F. Kelestimur, D. Macut, D. Micic, R. Pasquali, M. Pfeifer, D. Pignatelli, M. Pugeat, B.O Yildiz, ESE PCOS Special Interest Group, The Polycystic Ovary Syndrome : an Endocrinological Perspective from the European Society of Endocrinology, 171 (2014) 1–88, doi: 10.1530/EJE-14-0253
- [54] S. S. Lim, S. K. Hutchison, E. Van Ryswyk, R. J. Norman, H. J. Teede, L. J. Moran, Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome” *Cochrane Database Syst. Rev.*, 28 (2019) CD007506, doi: 10.1002/14651858.CD007506.pub4.
- [55] X. Qi, C. Yun, Y. Pang, J. Qiao, The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system, *Gut Microbes*, 13 (2021) 1–21, doi:

10.1080/19490976.2021.1894070.

- [56] G. Yurtdaş, Y. Akdevelioğlu, A New Approach to Polycystic Ovary Syndrome: The Gut Microbiota, *J. Am. Coll. Nutr.*, 39 (2020) 371–382, doi: 10.1080/07315724.2019.1657515
- [57] M. Mamas, W. B. Dunn, L. Neyses, R. Goodacre, The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease, *Arch. Toxicol.*, 85 (2011) 5–17, doi: 10.1007/s00204-010-0609-6.
- [58] Y. Shi-Kai, L. Run-Hui, J. Hui-Zi, L. Xin-Ru, Y. Ji, S. Lei, Z. Wei-Dong, ‘Omics’ in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives., *Chin. J. Nat. Med.*, 13 (2015) 3–21, doi: 10.1016/S1875-5364(15)60002-4
- [59] G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Innovation: Metabolomics: the apogee of the omic trilogy, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 13 (2012) 2504, doi: 10.1038/nrm3314.Metabolomics.
- [60] S. Barnes, H. P. Benton, K. Casazza, S. J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J.H. Kabarowski, S. Li, W. Pathmasiri, J. K. Prasain, M.B. Renfrow, H. K. Tiwari, Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data, *J. Mass Spectrom.*, 51 (2016) 461–475, doi: 10.1002/jms.3782.
- [61] B. J. Blaise, G. Correia, A. Tin, J. H. Young, A.-C. Vergnaud, M. Lewis, J. T. M. Pearce, P. Elliott, J. K. Nicholson, E. Holmes, T. M. D. Ebbels, Power Analysis and Sample Size Determination in Metabolic Phenotyping” *Anal. Chem.* 88 (2016) 5179–5188, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00188.
- [62] R. Chaleckis, I. Murakami, J. Takada, H. Kondoh, M. Yanagida, Individual variability in human blood Metabolites identifies age-related differences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113 (2016) 4252–4259, doi: 10.1073/pnas.1603023113.
- [63] M. K. Townsend, C. B. Clish, P. Kraft, Ch. Wu, A. L. Souza, A. A. Deik, S. S. Tworoger, B. M. Wolpin, Reproducibility of metabolomic profiles among men and women in two large cohort studies, 59 (2014) 1–16, doi: 10.1373/clinchem.2012.199133.
- [64] S. C. Moore, C. E. Matthews, J. N. Sampson, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. Zheng, Q. Cai, Y. Ting Tan, W.-H. Chow, B.-T. Ji, D. K. Liu, Q. Xiao, S. M. Boca, M. F. Leitzmann, G. Yang, Y. B. Xiang, R. Sinha, X. Ou Shu, A. J Cross, Human metabolic correlates of body mass index, *Metabolomics*, 10 (2014) 259–269, doi: 10.1007/s11306-013-0574-1.
- [65] D. Lent-Schochet, M. McLaughlin, N. Ramakrishnan, I. Jialal, Exploratory metabolomics of metabolic syndrome: A status report, *World J. Diabetes*, 10 (2019) 23–36, doi: 10.4239/wjd.v10.i1.23.
- [66] R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal, R. M. Weinshilboum, *Metabolomics: A global*

- biochemical approach to drug response and disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48 (2008) 653–683, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715.
- [67] P.-Ch. Hsu, R. S. Lan, T. M. Brasky, C. Marian, A. K. Cheema, H. W. Ransom, Ch. A. Loffredo, W. B. Pickworth, P. G. Shields, Metabolomic profiles of current cigarette smokers, *Mol. Carcinog.*, 14 (2018) 535–562, doi: 10.1002/mc.22519.Metabolomic.
- [68] T. Esko, J.N. Hirschhorn, H. A. Feldman, Y.-H. H. Hsu, A. A. Deik, C. B. Clish, C. B. Ebbeling, D. S. Ludwig, Metabolomic profiles as reliable biomarkers of dietary composition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 105 (2017) 547–554, doi: 10.3945/ajcn.116.144428.
- [69] Y. Sun, H. Zou, X. Li, S. Xu, C. Liu, Plasma Metabolomics Reveals Metabolic Profiling For Diabetic Retinopathy and Disease Progression, *Front. Endocrinol.*, 12 (2021) 1–11, doi: 10.3389/fendo.2021.757088.
- [70] Y. Wang, Y. Luo, S. Yang, M. Jiang, Y. Chu, LC-MS/MS-Based Serum Metabolomics and Transcriptome Analyses for the Mechanism of Augmented Renal Clearance, *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (2023) 10459, doi: 10.3390/ijms241310459.
- [71] K. Tzimas, E. Pappa, Saliva Metabolomic Profile in Dental Medicine Research: A Narrative Review, *Metabolites*, 13 (2023) 379, doi: 10.3390/metabo13030379.
- [72] R. Wang, H. Kang, X. Zhang, Q. Nie, H. Wang, Ch.Wang, S. Zhou, Urinary metabolomics for discovering metabolic biomarkers of bladder cancer by UPLC-MS, *BMC Cancer*, 22 (2012) 1–12, doi: 10.1186/s12885-022-09318-5.
- [73] D. J. Panyard, K. Mo. Kim, B. F. Darst, Y. K. Deming, X. Zhong, Y. Wu, H. Kang, C. M. Carlsson, S. C. Johnson, S. Asthana, C. D. Engelman, Q. Lu, Cerebrospinal fluid metabolomics identifies 19 brain-related phenotype associations, *Commun. Biol.*, 4 (2021) 1–11, doi: 10.1038/s42003-020-01583-z.
- [74] D. S. Wishart, Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes, *Physiol. Rev.*, 99 (2019) 1819–1875, doi: 10.1152/physrev.00035.2018.
- [75] R. J. Raterink, P. W. Lindenburg, R. J. Vreeken, R. Ramautar T. Hankemeier, Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 61 (2014) 157–167, doi: 10.1016/j.trac.2014.06.003.
- [76] D. Vuckovic, Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 1523–1548, doi: 10.1007/s00216-012-6039-y.
- [77] S. Naz, M. Vallejo, A. García, C. Barbas, Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics, *J. Chromatogr. A*, 1353 (2014) 99–105, doi: 10.1016/j.chroma.2014.04.071.

- [78] D. Dudzik, C. Barbas-Bernardos, A. García, and C. Barbas, Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 147 (2018) 149–173, doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.044.
- [79] S. Alseekh, A. Aharoni, Y. Brotman, K. Contrepois, J. D'Auria, J. Ewald, J. C. Ewald, P. D. Fraser, P. Giavalisco, R. D. Hall, M. Heinemann, H. Link, J. Luo, S. Neumann, J. Nielsen, L. Perez de Souza, K. Saito, U. Sauer, F. C. Schroeder, S. Schuster, G. S., A. Skirycz, L. W. Sumner, M. P. Snyder, H. Tang, T. Tohge, Y. Wang, W. Wen, S. Wu, G. Xu, N. Zamboni, A. R. Fernie, Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices, *Nat. Methods*, 18 (2021) 747–756, doi: 10.1038/s41592-021-01197-1.
- [80] T. Sangster, H. Major, R. Plumb, A. J. Wilson, I. D. Wilson, A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis, *Analyst*, 131 (2006) 1075–1078, doi: 10.1039/b604498k.
- [81] W. B. Dunn, D. Broadhurst, P. Begley, E. Zelena, S. Francis-McIntyre, N. Anderson, M. Brown, J. D. Knowles, A. Halsall, J. N. Haselden, A. W. Nicholls, I. D. Wilson, D. B. Kell, R. Goodacre, The Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium, Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, 6 (2011) 1060–1083, doi: 10.1038/nprot.2011.335
- [82] A. Alonso, S. Marsal, A. Julià, Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3 (2015) 1–20, doi: 10.3389/fbioe.2015.00023.
- [83] A. Cambiaghi, M. Ferrario, M. Masseroli, Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration, *Brief. Bioinform.*, 18 (2017) 498–510, doi: 10.1093/bib/bbw031.
- [84] N. R. Anwardeen, I. Diboun, Y. Mokrab, A. A. Althani, M. A. Elrayess, Statistical methods and resources for biomarker discovery using metabolomics, *BMC Bioinformatics*, 24 (2023) 1–18, doi: 10.1186/s12859-023-05383-0.
- [85] A. Gil de la Fuente, E. Grace Armitage, A. Otero, C. Barbas, J. Godzien, Differentiating signals to make biological sense – A guide through databases for MS-based non-targeted metabolomics, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2242–2256, doi: 10.1002/elps.201700070.
- [86] S. Barnes, H. P. Benton, K. Casazza, S. J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J. H. Kabarowski, S. Li, W. Pathmasiri, J. K. Prasain, M. B. Renfrow, H. K. Tiwari, Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future, *Physiol. Behav.*, 176 (2017) 139–148, doi: 10.1002/jms.3780.Training.
- [87] J. K. Nicholson, J. Connelly, J. C. Lindon, E. Holmes, Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function, 1 (2002) 3–11, 10.1038/nrd728

- [88] E. Dudley, M. Yousef, Y. Wang, W. J. Griffiths, Targeted metabolomics and mass spectrometry, *Adv Protein Chem Struct Biol.*, 80 (2010) 45-83, doi: 10.1016/B978-0-12-381264-3.00002-3
- [89] L. D. Roberts, A. L. Souza, R. E. Gerszten, C. B. Clish, Targeted metabolomics, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 30 (2012) 1–24, doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.
- [90] W. J. Griffiths, T. Koal, Y. Wang, M. Kohl, D. P. Enot, H. P. Deigner, Targeted metabolomics for biomarker discovery, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 49 (2010) 5426–5445, doi: 10.1002/anie.200905579.
- [91] Pawliszyn J., *Handbook of solid phase microextraction*, Chemical Industry Press, Beijing 2009.
- [92] Food and Drug Administration (FDA), *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*, 2018.
- [93] European Medicines Agency (EMA), *ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation*, 2023.
- [94] B. M. Warrack, S. Hnatyshyn, K. Heinz Ott, M. D. Reily, M. Sanders, H. Zhang, D. M. Drexler, Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 877 (2009) 547–552, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.01.007.
- [95] E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998.
- [96] S. G. Villas-Bôas, S. Mas, M. Åkesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Mass spectrometry in metabolome analysis, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 613–646, doi: 10.1002/mas.20032
- [97] D. J. Beale, F. R. Pinu, K. A. Kouremenos, M. M. Poojary, V.K. Narayana, B. A. Boughton, K. Kanojia, S. Dayalan, O. A. H. Jones, D. A. Dias, Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research, *Metabolomics*, 14 (2018) doi: 10.1007/s11306-018-1449-2.
- [98] K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock “Mass Spectrometry-Based Metabolomics, *Mass Spectrom. Rev.*, 26 (2007) 51–78, doi: 10.1097/OPX.0b013e3182540562.The.
- [99] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, Analytical technologies for metabolomics and metabolomics, and multi-omic information recovery, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 194–204, doi: 10.1016/j.trac.2007.08.009.
- [100] T. A. H. Fonseca, C. P. Von Rekowski, R. Araújo, M. Conceição Oliveira, G. C. Justino, L. Bento, C. R. C. Calado, The impact of the serum extraction protocol on metabolomic profiling using UPLC-MS/MS and FTIR spectroscopy, *ACS Omega*, 8 (2023) 20755–20766, doi: 10.1021/acsomega.3c01370.

- [101] C. O. Elisabeth Stener-Victorin, Goran Holm, Fernard Labrie, Lars Nilsson, Per Olof Janson, “Are There Any Sensitive and Specific Sex Steroid Markers for Polycystic Ovary Syndrome?,” *TheJournal Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 2, pp. 810–819, 2010.
- [102] W. Wang, S. Wang, S. Tan, M. Wen, Y. Qian, X. Zeng, Y. Guo, Ch. Yu, Detection of urine metabolites in polycystic ovary syndrome by UPLC triple-TOF-MS, *Clin. Chim. Acta*, 448 (2015) 39–47, doi: 10.1016/j.cca.2015.06.008.
- [103] W. Struck-Lewicka, B. Karpińska, W. Rodzaj, A. Nasal, B. Wielgomas, M. J. . Markuszewski, D. Siluk, Development of the thin film solid phase microextraction (TF-SPME) method for metabolomics profiling of steroidal hormones from urine samples using LC-QTOF/MS, *Front. Mol. Biosci.*, 10 (2023) 1–12, doi: 10.3389/fmolb.2023.1074263.
- [104] J. E. Nestler, D. J. Jakubowicz, A. F. De Vargas, C. Brik, N. Quintero, F. Medina, Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, (1998) 2001–2005, doi: 10.1210/jc.83.6.2001.
- [105] A. Dunaif, X. Wu, A. Lee, E. Diamanti-Kandarakis, Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS), *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 281 (2001) 392–399, doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.2.e392.
- [106] E. Diamanti-Kandarakis, A. G. Papavassiliou, Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome, *TRENDS in Molecular Medicin2*, 12 (2006) 324–332, doi: 10.1016/j.molmed.2006.05.006