

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

MEDICINĂ GENERALĂ

**INSULINOREZISTENȚA ȘI ROLUL SĂU ÎN PATOLOGIA
METABOLICĂ ȘI ENDOCRINĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

ACAD. PROF. DR IONESCU-TÎRGOVIȘTE CONSTANTIN

Student doctorand:

STOICA ROXANA ADRIANA

2021

Cuprins

Listă cu lucrări științifice publicate (pagina 5)

Listă abrevieri (pagina 7)

Introducere (pagina 12)

I. Partea generală

1.Hipotiroidismul și insulinorezistența

- 1.1. Definiții (pagina 16)
- 1.2. Scurt istoric (pagina 16)
- 1.3. Epidemiologia patologiei tiroidiene și a insulinorezistenței în România (pagina 17)
- 1.4. Glanda tiroidă și hormonii tiroidieni (pagina 18)
- 1.5. Patogenia hipotiroidismului (pagina 19)
- 1.6. Determinarea hormonilor tiroidieni (pagina 20)
- 1.7. Tratamentul hipotiroidismului (pagina 20)
- 1.8. Patogenia insulinorezistenței (pagina 21)
- 1.9. Metode de determinare a insulinorezistenței (pagina 25)
- 1.10. Legătura dintre hipotiroidism și insulinorezistență (pagina 30)
- 1.11. Consecințe ale hipotiroidismului (pagina 36)
- 1.12. Alți mediatorii ai insulinorezistenței în patologia tiroidiană (pagina 37)

2.Rolul citokinelor și al chemokinelor în hipotiroidism și insulinorezistență

- 2.1. Definiție (pagina 39)
- 2.2. Clasificare (pagina 39)
- 2.3. Mecanism patogen general (pagina 40)
- 2.4. Fractalkina sau CXCL3 (pagina 42)
- 2.5. IFN- γ induced protein 10 (IP-10) sau CXCL-10 (pagina 49)
- 2.6. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (pagina 51)
- 2.7. IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC sau CXCL-11) (pagina 53)
- 2.8. Interleukina-8 (IL-8 sau CXCL8) (pagina 53)
- 2.9. Interleukina-6 (IL-6) (pagina 55)
- 2.10. Interleukina-1 β (IL-1 β) (pagina 57)
- 2.11. Factorul de necroză tumorală- α (TNF- α) (pagina 58)
- 2.12. Adiponectina (pagina 60)
- 2.13. Leptina (pagina 61)
- 2.14. Resistina (pagina 63)

II. Contribuții personale

3. Ipoteza de lucru și obiective generale (pagina 65)

4. Metodologia generală a cercetării (pagina 67)

5. Studiu caz-control pentru investigarea relației dintre hipotiroidismul subclinic și insulinorezistență în populația de femei adulte (studiu 1)

5.1. Introducere (pagina 70)

5.2. Material și metodă (pagina 70)

5.3. Rezultate (pagina 73)

5.4. Discuții (pagina 80)

5.5. Concluzii (pagina 81)

6. Asocierea dintre nivelul 25-hidroxitaminei D (OHD), indicii de insulinorezistență și hormonii tiroidieni într-un studiu cross-sectiional în populația din România (studiu 2)

6.1. Introducere (pagina 82)

6.2. Material și metodă (pagina 84)

6.3. Rezultate (pagina 85)

6.4. Discuții (pagina 94)

6.5. Concluzii (pagina 98)

7. Evaluarea relației dintre chemokinele serice și insulinorezistență la pacientele cu hipotiroidism (studiu 3)

7.1. Introducere (pagina 99)

7.2. Material și metodă (pagina 100)

7.3. Rezultate (pagina 102)

7.4. Discuții (pagina 131)

7.5. Concluzii (pagina 134)

8. Dezvoltarea unui senzor stohastic pentru analiza fractalkinei la pacienții cu prediabet, diabet zaharat tip 2 și obezitate (studiu 4)

8.1. Introducere (pagina 135)

8.2. Material și metodă (pagina 136)

8.3. Rezultate (pagina 137)

8.4. Discuții (pagina 139)

8.5. Concluzii (pagina 140)

9. Concluzii și contribuții personale (pagina 141)

Bibliografie (pagina 145)

Anexe (pagina 181)

Rezumat

Stadiul actual al cunoașterii și fundamentul cercetării doctorale

Insulinorezistența (IR) este un concept integrativ ce se referă la modificarea răspunsului la insulină al țesuturilor dependente de acțiunea acesteia. Ea se caracterizează prin o scădere a capacității țesutului adipos, muscular și hepatic de a prelua glucoza în condițiile unui nivel normal al insulinei, atât în status anabolizant (obezitate, hipotiroidism), cât și în status catabolizant (boli consumptive, hipertiroidism). Cel mai frecvent, IR este o consecință a modificării țesutului adipos în obezitate, dar ea este influențată și de prezența altor patologii precum sindromul de ovare polichistice sau disfuncția tiroidiană. IR reprezintă un domeniu de cercetare intens valorificat și de actualitate având în vedere frecvența crescută a obezității, prediabetului și patologiei tiroidiene în populația caucaziană. Inter-relația dintre IR și hipotiroidism este un subiect de dezbatere.

Dintre bolile tiroidiene, prevalența gușei simple și nodulare a crescut cu 30%, cea a tiroiditei autoimune cu 71%, iar a hipotiroidismului cu 58% în decurs de 6 ani. Hipotiroidismul cauzat de carența de iod este mai frecvent în rândul femeilor (86% din populația afectată). Această creștere a prevalenței patologiei tiroidiene se suprapune peste creșterea prevalenței prediabetului – cu o valoare de 16,5% la ultimul studiu epidemiologic din România. Frecvența maximă este în rândul femeilor în grupa de vârstă 60-79 ani. Cele două populații au factori de risc comuni-obeziitatea, în special cea abdominală și dislipidemia. Astfel, cele două patologii se pot asocia frecvent, mai ales în rândul pacienților de gen feminin.

Mecanismele prin care statusul tiroidian influențează greutatea și cele prin care IR afectează morfologia și funcția glandei tiroidice nu sunt cunoscute exact. În literatura de specialitate există argumente pro și contra referitor la faptul că hipotiroidismul se asociază cu insulinorezistență și prediabet. A fost observată o creștere a prevalenței sindromului metabolic la valori ale tirotropinei (TSH) la limita superioară a normalului. Prima ipoteză incriminată este aceea că obezitatea secundară scăderii ratei metabolice bazale din hipotiroidism va determina creșterea insulinemiei și a formei libere a insulin growth factor 1 (IGF-1). Acești doi hormoni fiind factori de creștere celulară vor determina proliferarea celulelor tiroidiene și creșterea vascularizației locale. Astfel, va fi afectată sinteza glandulară și creșterea rezistenței la hormonii

tiroidieni. Un studiu observațional în care valori mai mari ale indicilor de rezistență la hormonii tiroidieni s-au asociat cu sindrom metabolic și diabet vine să susțină această ipoteză.

A doua ipoteză susține că IR se asociază cu modificarea producției de citokine, chemokine și alți disrumptori endocrini. O serie de adipokine au fost studiate, dintre care leptina ar putea explica parțial această relație. Chemokinele au fost studiate separat pentru pacienții cu prediabet, respectiv patologie tiroidiană. Din recenzia literaturii am găsit studii observaționale legate de subiectul tezei de doctorat pentru: TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), interleukina-6, interleukina-8 (IL-8), interleukina-1 β , ITAC sau CXCL-11 (Interferon-inducible T Cell Alpha Chemoattractant), IP-10 sau CXCL-10 (interferon-inducible protein 10), fractalkina sau CX3CL1.

IR se asociază cu un status proinflamator caracterizat de creșterea IL-1, TNF- α , MCP-1 și interferonului γ (IFN- γ) care poate duce la activarea autoimunității, una din consecințe fiind disfuncția tiroidiană. În medierea stresului inflamator intervin și alți hormoni precum vitamina D, ce a fost asociată cu declanșarea tiroiditei autoimune.

Chemokinele care au capacitatea de a influența migrarea leucocitelor atât în cazul unui status inflamator, cât și în condiții fiziologice. Comportamentul heterogen al acestora dat de interacțiunea cu mai mulți receptori cuplați cu proteinele G, a făcut ca înțelegerea lor să fie un proces lent. De aceea ne-am propus să analizăm concentrațiile chemokinelor la pacientele cu hipotiroidism subclinic cu sau fără insulinoză asociată.

O altă problemă fundamentală este dată de metodele de determinare pentru aceste moleculele mici. În afara celor clasice de laborator bazate pe reacții imuno-enzimatică, există și metode electrochimice. Una dintre ele este cea a senzorilor stochastici. Principiul metodei se bazează pe conductivitatea unor nanocanale (pori) formate la nivelul materialelor precum grafenă sau diamant (care formează senzorul propriu-zis împreună cu alte molecule adăugate), atunci când se aplică un potențial constant și se înregistrează curentul de către un dispozitiv special (potențiostat). Parametrii mășurați sunt t_{off} și t_{on} care apar pe diagramele softului conectat la potențiostat. Valorile t_{off} sunt specifice fiecărui biomarker, deci corespund unei determinări calitative. Determinarea cantitativă se face prin măsurarea t_{on} . Ne-am propus crearea unui senzor pentru fractalkină împreună cu echipa de cercetare a Laboratorului de Tehnologie analitică de Proces (PATLAB) cu scopul de a îmbunătăți modalitatea de determinare actuală. Avantajele acestei metode sunt costurile reduse, posibilitatea de a determina mai mulți analiți simultan în

cantități foarte mici, utilizarea pentru mai multe probe biologice – sânge integral, salivă, urină. Durata unui test este relativ scurtă, iar probele nu necesită o prelucrare anterioară.

Sinteza capitolelor

Partea generală a tezei de doctorat este formată din două capitole. *Capitolul 1* este dedicat relației dintre hipotiroidism și insulinorezistență. Am început redactarea cu definiția celor două concepte, un scurt istoric și câteva date epidemiologice. Am abordat fiziologia și patogenia hipotiroidismului și importanța sa în practică, inclusiv modalități de determinare a hormonilor tiroidieni. Apoi, am realizat o sinteză legată de patogenia insulinorezistenței și moduri de apreciere a insulinorezistenței. Subcapitolul 1.10 face legătura între cele două subiecte de cercetare, urmând apoi prezentarea consecințelor hipotiroidismului și importanța studierii problemei.

În *Capitolul 2* am abordat citokinele și chemokinele ca factori patogenici și de legătură între hipotiroidism și insulinorezistență. Primul subcapitol definește chemokinele, apoi este urmat de clasificarea lor și mecanismul patogen general. Am ales să prezint fiecare chemokină descrisă până în prezent în literatura de specialitate ca având un rol în cele două patologii ca și subcapitole separate.

Am formulat **ipotezele de cercetare** în *Capitolul 3*. În primul rând, am presupus că există o diferență în ceea ce privește insulinorezistența între pacienții cu hipotiroidism și cele eutiroidiene. Pentru a demonstra această ipoteză am realizat trei studii observaționale. Ne-am propus să caracterizăm populația cu IR și relația cu ceilalți factori de risc precum 25-hidroxitamina D (25OHD). Pentru a avea o contribuție integrativă în relația IR-hipotiroidism, mi-am ales să analizez diferențele legate de concentrația chemokinelor pentru mai multe grupuri, cu sau fără hipotiroidism cu ajustarea în funcție de alți factori de confuzie precum greutatea sau statusul autoimun. În al doilea rând, am realizat un studiu experimental pe baza ipotezei că senzorul stochastic dezvoltat are sensibilitate și limite de detecție bune pentru fractaklină în comparație cu metoda standard bazată pe imunofluorescență.

Ca obiective ale cercetării, mi-am propus să analizez dacă prezența hipotiroidismului se asociază cu o creștere a IR; să determin prevalența hipotiroidismului și a insulinorezistenței în

populația din România; să investighez alți factori implicați în IR - vitamina D; să descriu relația dintre o serie de chemokine și adipokine la pacientele cu hipotiroidism; să colaborez cu alte echipe de cercetare în vederea dezvoltării unei noi metode stochastice de determinare a chemokinelor.

Metodologia de cercetare este prezentată în *Capitolul 4*. Pacientele incluse în studii s-au prezentat consecutiv în regim ambulator pentru evaluarea de rutină a obezității, prediabetului, a bolii tiroidiene sau a osteoporozei. Studiile au urmat principiile Declarației de la Helsinki. Fiecare pacientă a semnat consimțământul informat de participare la studiu și acordul de prelucrare a datelor cu caracter personal. Am obținut aprobarea Comisiei de etică a Departamentului de Diabet al Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila cu sediul în Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice NC Paulescu, București, România.

Probele de sânge au fost analizate de același laborator: fie la scurt timp după recoltare (analize biochimice și hormonale), fie la 6 luni, după păstrare la -70 grade (chemokine sanguine). Am evaluat funcția tiroidiană măsurând hormonul stimulator tiroidian (TSH) și tiroxina liberă (fT4). IR a fost calculată prin formule standard sau calculatoare pentru evaluarea modelului homeostatic (HOMA), indicele QUICKI și raportul trigliceride / lipoproteina cu densitate ridicată. Rezistența la hormonii tiroidieni a fost calculată prin formule standardizate descrise anterior. Parametrii clinici incluși au fost greutatea, talia și indicele de masă corporală (IMC), iar în cel de-al treilea studiu compoziția corpului a fost evaluată prin bioimpedență profesională.

Pentru crearea bazelor de date am folosit patru fișiere Microsoft Office Excel® (Microsoft Corp, Washington, Statele Unite, 2007). Au fost efectuate analize statistice inferențiale cu mediul de calcul și programare R v. 4.0.3, sub terminalul local RStudio - v. 1.1.456, precum și SPSS® versiunea 20.

În primul studiu efectuat (*Capitolul 5*), la analiza pe o perioadă de un an, prezența hipotiroidismului în antecedente nu a crescut riscul ca pacientele să aibe insulinorezistență. Evoluția către hipotiroidismului clinic și, respectiv diabet, nu a avut un efect semnificativ asupra IR.

Deși review-ul general al datelor din literatură tinde să favorizeze existența unei relații între hipotiroidism și IR, trebuie menționat că această ipoteză se bazează pe studii

observaționale. Avantajul studiului nostru este designul care ne-a permis să evaluăm IR și funcția tiroidiană în diferite perioade de timp. De asemenea, analizarea probelor de către același laborator conferă o uniformitate a datelor. Susceptibilitatea pentru biasul de reamintire și părtinirea informațiilor este redusă, deoarece am avut acces direct la baza de date a laboratorului.

Am reușit să ajustăm analizele noastre multivariate pentru vârstă, profilul lipidic și tratament, dar una dintre limite este absența altor teste hormonale de sânge (controlul altor variabile posibile nu poate fi complet controlat ca pentru toate studiile caz-control). Dimensiunea relativ mică a eșantionului ar putea influența rezultatele, precum și valoarea TSH. Este posibil ca relația să fie evidentă doar la valori ale TSH-ului mai mari.

În al doilea studiu (*Capitolul 6*) nu au existat asociații semnificative între 25OHD și IR. Am observat o corelație slabă pozitivă între un nivel mai ridicat de 25OHD și o creștere a HbA1c, HOMA-IR2 (peptid C), precum și o scădere a QUICKI. IMC a avut cea mai puternică asociere cu variabilele de răspuns luate în considerare. Alți factori modificabili sau nemodificabili depășesc influența 25OHD asupra IR la femeile adulte cu un nivel seric normal și pot contribui la restul variabilității observate. Suplimentarea este recomandată la pacienții cu deficit de vitamina D și sunt necesare studii suplimentare pentru a demonstra efectele pleiotropice în cohortele din viața reală care au frecvent boli endocrine asociate.

Am emis ipoteza că statusul pro-inflamator indus de obezitate prin hipertrofia adipocitară și excesul de acizi grași liberi, asociat sau nu cu hipotiroidism, se traduce prin secreția crescută de chemokine. Prin urmare, am realizat un studiu observațional (*Capitol 7*), cross-secțional ce a inclus pacientele prezentate consecutiv pentru evaluare nutrițională în cadrul unui cabinet de diabetologie din ambulator. Din analiza corelației am obținut o asociere pozitivă semnificativă între toți indicii HOMA-IR și proteina C reactivă (PCR), feritină. HOMA-IR derivat din insulină identifică mai bine cazurile de IR comparativ cu ceilalți indici. La pacientele cu hipotiroidism subclinic, HOMA-IR 1 și 2 (insulină) s-a corelat pozitiv cu I-TAC. De asemenea, acest grup de paciente a avut valori mediane mai mari ale IL-8, asemănător grupului cu diabet la debut.

Încercarea de a modela HOMA-IR1 și 2 (insulină) în funcție de chemokine (IL-8, ITAC, IP-10, leptina), prezența sau absența hipotiroidismului subclinic și PCR, luând în considerare

drept covariate vârsta, IMC, circumferința abdominală, hemoglobina glicată și ATPO (Anticorpi anti-peroxidază tiroidiană) a identificat o singură chemokină care să se asocieze în mod semnificativ statistic cu variabila dependentă (IL-8), însă cu un efect neglijabil, practic ne semnificativ clinic. Sunt necesare studii care să includă un număr mai mare de pacienți pentru a demonstra dacă IL-8 a fost crescută întâmplător în populația noastră, dacă există un mecanism comun de creștere în ambele patologii, sau un mecanism independent.

Indicii de sensibilitate/rezistență la hormonii tiroidieni, TSHI și TT4RI sunt invers corelați cu rezistina serică, de aceea rolul posibil al acestei chemokine, alături de leptină trebuie investigat mai departe. Prin urmare, creșterea mai mare a valorilor I-TAC, leptinei și rezistinei de la nivel adipocitar ar putea determina scăderea sensibilității la hormonii tiroidieni, precum și o creștere mai rapidă a insulinoresistenței față de populația de femei obeze eutiroidiene.

De asemenea, în cadrul studiilor doctorale am participat la proiectul de cercetare UEFISCDI, PNCDI III, PN-III-P4-ID-PCE-2016-0120, ce a avut ca obiectiv dezvoltarea senzorilor stocastici în diagnosticul precoce al prediabetului și diabetului. Ulterior, în cadrul unui studiu experimental (*Capitol 8*) am participat la perfecționarea unui senzor stocastic pentru detectarea fractalkinei la pacienții cu prediabet și obezitate, una din chemokinele folosite în cel de-al treilea studiu. Am ales acest analit deoarece a avut concentrația mediană cea mai mare în grupul de pacienți cu prediabet. Senzorul a avut o limită de detecție bună a acestei chemokine.

Contribuții personale (*Capitol 9*)

În domeniul studiilor epidemiologice pe populația română: am descris prevalența insulinoresistenței și a patologiilor tiroidiene; am descris relația dintre funcția tiroidiană și insulinoresistență (am contribuit cu o publicație în revistă indexată ISI); am descris relația dintre 25 hidroxi vitamina D și insulinoresistență (am contribuit cu o publicație în revistă indexată ISI).

În domeniul studierii biomarkerilor cu rol în insulinoresistență: am descris pentru prima dată rolul chemokinelor în apariția insulinoresistenței la pacienții cu patologie tiroidiană; am contribuit la dezvoltarea unei noi metode de determinare folosind senzori stocastici a fractalkinei la pacienții cu prediabet, diabet și obezitate (datele urmează să fie publicate).

Bibliografie

Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Buonamano A, Ferrannini E, Serio M. High levels of circulating CXC chemokine ligand 10 are associated with chronic autoimmune thyroiditis and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5496-5499, 2004.

Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Paolicchi A, Ferrannini E, Serio M. Increase of interferon-gamma inducible alpha chemokine CXCL10 but not beta chemokine CCL2 serum levels in chronic autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 152(2):171-7, 2005.

Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. Increase of interferon- γ inducible CXCL9 and CXCL11 serum levels in patients with active Graves' disease and modulation by methimazole therapy. *Thyroid.* 23(11):1461-9, 2013.

Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 13(3):272-80, 2014.

Aoki Y, Belin RM, Clickner R, Jeffries R, Phillips L, Mahaffey KR. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002). *Thyroid.* 17(12):1211-23, 2007.

Baldane S, Ipekci SH, Ekin A, Abusoglu S, Unlu A, Kebapcilar L. Evaluation of fractalkine (FKN) and secreted frizzled-related protein 4 (SFRP-4) serum levels in patients with prediabetes and type 2 diabetes. *Bratisl Lek Listy.* 119(2):112–115, 2018.

Ferrannini E, Iervasi G, Cobb J, Ndreu R, Nannipieri M. Insulin resistance and normal thyroid hormone levels: prospective study and metabolomic analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 312(5):E429–E436, 2017.

Institutul Național de Statistică -https://www.thyroidaware.com/content/dam/web/health-care/biopharma/thyroidweek/ITAW_105_190mm_002.pdf și <https://raportuldegarda.ro/tiroida-la-control-bolile-tiroidiene-foarte-frecvente-in-romania/> (Accesat la data de 09.01.2021)

Laclaustra M, Moreno-Franco B, Lou-Bonafonte JM, et al. Impaired sensitivity to thyroid hormones is associated with diabetes and metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 42:303–10, 2019.

Popa S, Mota M, Popa A, Mota E, Timar R, Serafinceanu C, Cheta D, Graur M, Hancu N. Prevalence of dyslipidemia and its association with cardiometabolic factors and kidney

function in the adult Romanian population: The PREDATORR study. *Diabetes Metab Syndr.* 13(1):596-602, 2019.

Răcățăianu N, Leach N, Bondor CI, Mârza S, Moga D, Valea A, and Ghervan C. Thyroid disorders in obese patients. Does insulin resistance make a difference? *Arch Endocrinol Metab* 61:575-583, 2017.

Shah JH, Motto GS, Papagiannes E, Williams GA. Insulin metabolism in hypothyroidism. *Diabetes.* 24(10):922-5, 1975.

Stefan-van Staden RI, Gugoasa LA, Biris AR. Pattern recognition of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in whole blood samples using new platforms based on nanostructured materials. *Nanoscale.* 7(36):14848–14853, 2015.

Listă cu lucrări științifice publicate

Stoica RA, Guja C, Pantea-Stoian A, van Staden RI, Popa-Tudor I, Ștefan SD, Ancuceanu R, Serafinceanu C, Ionescu Tîrgoviște C. No Association between 25-Hydroxyvitamin D and Insulin Resistance or Thyroid Hormone Concentrations in a Romanian Observational Study. *Medicina (Kaunas)*. 2020 Dec 30;57(1):25. doi: 10.3390/medicina57010025. **(IF-1.2)**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33396784/>

Stoica RA, Ancuceanu R, Costache A, Ștefan SD, Stoian AP, Guja C, van Staden RI, Popa-Tudor I, Serafinceanu C, Ionescu-Tîrgoviște C. Subclinical hypothyroidism has no association with insulin resistance indices in adult females: A case-control study. *Exp Ther Med*. 2021 Sep;22(3):1033. doi: 10.3892/etm.2021.10465. **(IF-1.7)**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34373719/>

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

”CAROL DAVILA”, BUCHAREST

DOCTORAL SCHOOL

GENERAL MEDICINE

INSULIN RESISTANCE AND ITS ROLE IN METABOLIC AND

ENDOCRINE PATHOLOGY

PHD THESIS ABSTRACT

PhD supervisor:

ACAD. PROF. DR IONESCU-TÎRGOVIȘTE CONSTANTIN

PhD student:

STOICA ROXANA ADRIANA

2021

Table of content

List with published articles (page 5)

Abbreviation list (page 7)

Introduction (page 12)

I. General part

1. Hypothyroidism and insulin resistance

- 1.1. Definition (page 16)
- 1.2. History (page 16)
- 1.3. Thyroid pathology and insulin resistance epidemiology in Romania (page 17)
- 1.4. Thyroid gland and its hormones (page 18)
- 1.5. Hypothyroidism pathogeny (page 19)
- 1.6. Thyroid hormones determination (page 20)
- 1.7. Hypothyroidism treatment (page 20)
- 1.8. Insulin resistance pathogeny (page 21)
- 1.9. Methods for determining insulin resistance (page 25)
- 2.10. The relation between hypothyroidism and insulin resistance (page 30)
- 2.11. Hypothyroidism consequences (page 36)
- 2.12. Other mediators of insulin resistance in thyroid pathology (page 37)

2. The role of chemokines in hypothyroidism and insulin resistance

- 2.1. Definition (page 39)
- 2.2. Classification (page 39)
- 2.3. General pathogenic mechanism (page 40)
- 2.4. Fractalkine or CX3C1 (page 42)
- 2.5. IFN- γ induced protein 10 (IP-10) or CXCL-10 (page 49)
- 2.6. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (page 51)
- 2.7. IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC or CXCL-11) (page 53)
- 2.8. Interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) (page 53)
- 2.9. Interleukin-6 (IL-6) (page 55)
- 2.10. Interleukin-1 β (IL-1 β) (page 57)
- 2.11. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) (page 58)
- 2.12. Adiponectin (page 60)
- 2.13. Leptin (page 61)
- 2.14. Resistin (page 63)

II. Personal contributions

3. Research hypothesis and objectives (page 65)

4. Materials and methods (page 67)

5. A case-control study for investigating the relation between subclinical hypothyroidism and insulin resistance in female adult population (study 1)

5.1. Introduction (page 70)

5.2. Materials and methods (page 70)

5.3. Results (page 73)

5.4. Discussions (page 80)

5.5. Conclusions (page 81)

6. The association between 25-hydroxi vitamin D (25OHD), insulin resistance and thyroid hormones in a cross-sectional study in Romanian population (study 2)

6.1. Introduction (page 82)

6.2. Materials and methods (page 84)

6.3. Results (page 85)

6.4. Discussions (page 94)

6.5. Conclusions (page 98)

7. Serum citokines, chemokines and insulin resistance in adult females with thyroid pathology (study 3)

7.1. Introduction (page 99)

7.2. Materials and methods (page 100)

7.3. Results (page 102)

7.4. Discussions (page 131)

7.5. Conclusions (page 134)

8. The development of a stochastic sensor for fractalkine analysis in patients with prediabetes, diabetes and obesity (study 4)

8.1. Introduction (page 135)

8.2. Materials and methods (page 136)

8.3. Results (page 137)

8.4. Discussions (page 139)

8.5. Conclusions (page 140)

9. Conclusions and personal contributions (page 141)

Bibliography (page 145)

Annexes (page 181)

Abstract

Background

Insulin resistance (IR) is an integrative concept that refers to the modification of the insulin response of tissues dependent on its action. It is characterized by a decrease in the ability of adipose, muscle and liver tissue to take up glucose under normal insulin levels, both in anabolic status (obesity, hypothyroidism), and in catabolic status (consumptive diseases, hyperthyroidism). Most often, IR is a consequence of the changes in the adipose tissue in obesity, but it is also influenced by the presence of other pathologies such as polycystic ovary syndrome or thyroid dysfunction. IR is an area of intensive research given the increased frequency of obesity, prediabetes and thyroid disease in the Caucasian population. The relationship between IR and hypothyroidism is a matter of debate.

Among thyroid diseases, the prevalence of simple and nodular goiter increased by 30%, that of autoimmune thyroiditis by 71%, and hypothyroidism by 58% within 6 years. Hypothyroidism caused by iodine deficiency is more common among women (86% of the affected population). This increase in the prevalence of thyroid pathology overlaps with the increase in the prevalence of prediabetes - with a value of 16.5% in the last epidemiological study in Romania. The maximum frequency is among women in the age group 60-79 years. The two populations have common risk factors - obesity, especially abdominal type, and dyslipidemia. Thus, the two pathologies can be frequently associated, especially among female patients.

The mechanisms by which thyroid status influences weight, and those by which IR affects the morphology and function of the thyroid gland are not known exactly. There are pros and cons in the literature that hypothyroidism is a risk factor for insulin resistance and prediabetes. An increase in the prevalence of metabolic syndrome was observed at the upper limit of the normal values of thyrotropin (TSH). The first hypothesis incriminated is that obesity secondary to decreased basal metabolic rate due to hypothyroidism will increase insulinemia and the free form of insulin growth factor 1 (IGF-1). These two hormones being factors of cell growth will cause the proliferation of thyroid cells and increased local vascularity. Thus, glandular synthesis and increased resistance to thyroid hormones will be affected. An

observational study in which higher values of thyroid hormone resistance indices were associated with metabolic syndrome and diabetes supports this hypothesis.

The second hypothesis claims that IR is associated with an altered production of cytokines, chemokines and other endocrine disruptors. A number of adipokines have been studied, of which leptin may partially explain this relationship. Chemokines were studied separately for patients with prediabetes and thyroid pathology, respectively. From the literature review we found observational studies related to the subject of the doctoral thesis for: TNF- α (Tumor Necrosis Factor), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), interleukin-6, interleukin-8 (IL-8), interleukin-1 β , ITAC or CXCL-11 (Interferon –Inducible T Cell Alpha Chemoattractant), IP-10 or CXCL-10 (interferon-inducible protein 10), fractalkine or CX3CL1.

IR is associated with a proinflammatory status characterized by increased IL-1, TNF- α , MCP-1, and interferon γ (IFN- γ) which will lead to the activation of autoimmunity, one of the consequences being thyroid dysfunction. Other hormones such as vitamin D, which has been associated with the onset of autoimmune thyroiditis, also mediate inflammatory stress.

Chemokines that have the ability to influence the migration of leukocytes, both in the case of an inflammatory status and in physiological conditions. Their heterogeneous behavior due to the interaction with several G protein-coupled receptors, made their understanding a slow process. Therefore, we aimed to analyze chemokine concentrations in patients with subclinical hypothyroidism with or without associated insulin resistance.

Another fundamental problem is given by the methods of determination for these small molecules. In addition to the standard laboratory assays based on immunoenzymatic reactions, electrochemical methods are developing. One of them is that of stochastic sensors. The principle of the method is based on the conductivity of nanochannels (pores) formed in materials such as graphene or diamond (which form the sensor itself together with other added molecules), when a constant potential is applied, and the current is measured by a special device (potentiostat). The measured parameters are t_{off} and t_{on} that appear on the diagrams of the software connected to the potentiostat. The t_{off} values are specific to each biomarker, so they correspond to a qualitative determination. Quantitative determination is done by measuring the t_{on} . The objective was to create a fractalkine sensor in collaboration with research team of the Process Analytical Technology Laboratory in order to improve the current determination method. The advantages of this method are low costs, the ability to determine several tests simultaneously in very small

quantities, the possibility to use several biological samples - whole blood, saliva, urine. The duration of a test is relatively short, and the samples do not require prior processing.

Synthesis of chapters

The general part of the doctoral thesis consists of two chapters. *Chapter 1* is dedicated to the relationship between hypothyroidism and insulin resistance. It begins with the definition of the two concepts, a short history and some epidemiological data. We addressed the physiology and pathogenesis of hypothyroidism and its importance in practice, including ways to determine thyroid hormones. Then, we made a synthesis related to the pathogenesis of insulin resistance and ways of assessing insulin resistance. Subchapter 1.10 makes the connection between the two research topics, followed by the presentation of the consequences of hypothyroidism and the importance of studying the subject.

In *Chapter 2* we addressed cytokines and chemokines as pathogenic factors involved in hypothyroidism and insulin resistance. The first subchapter defines chemokines, afterwards is followed by the classification and general pathogenic mechanism. I chose to present each chemokine described so far in the two pathologies as separate subchapters.

We formulated the **research hypothesis** in *Chapter 3*. First, we assumed that there is a difference in insulin resistance between patients with hypothyroidism and euthyroid patients. To prove this hypothesis, I conducted three observational studies. I aimed to characterize the population with IR and the relationship with other risk factors such as 25hydroxyvitamin D. In order to have an integrative contribution in the relationship IR-hypothyroidism, I analyzed the differences related to the concentration of chemokines for several subgroups, with or without hypothyroidism after adjusting for confounding factors like weight or autoimmunity status. Second, I assumed that the stochastic sensor we developed has good sensitivity and detection limits for fractakline, compared to the standard method based on immunofluorescence.

As **research objectives**, we aimed to analyze whether the presence of hypothyroidism is associated with an increase in IR; to determine the prevalence of hypothyroidism and insulin resistance in the Romanian population; to investigate other factors involved in IR - vitamin D; to describe the relationship between a range of chemokines and adipokines in patients with

hypothyroidism; to collaborate with other research teams in order to develop a new stochastic method for the determination of chemokines.

The **research methodology** is written in *Chapter 4*. The patients included in the studies presented consecutively on an outpatient clinic for routine assessment of obesity, prediabetes, thyroid disease or osteoporosis. The studies followed the principles of the Helsinki Declaration. Each patient signed the informed consent to participate in the study and the agreement to process personal data. We obtained the approval of the Ethics Commission of the Diabetes Department of the Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, located in the National Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases NC Paulescu, Bucharest, Romania.

Blood samples were analyzed by the same laboratory: either shortly after collection (biochemical and hormonal analyzes), or at 6 months, after storage at -70 degrees (blood chemokines). We evaluated thyroid function by measuring thyroid stimulating hormone (TSH) and free thyroxine (fT4). IR was calculated by standard formulas or calculators for homeostatic model assessment (HOMA), QUICKI index, and triglycerides/high density lipoprotein cholesterol ratio. Resistance to thyroid hormones was calculated using the standardized formulas described in literature. The included clinical parameters were weight, height and body mass index (BMI), and in the third study the body composition was assessed by professional bioimpedance.

To create the databases we used four Microsoft Office Excel® files (Microsoft Corp, Washington, USA, 2007). Inferential statistical analyzes were performed with the computing and programming environment R v. 4.0.3, under the local terminal RStudio - v. 1.1.456, as well as SPSS version 20.

In the first study performed (*Chapter 5*), at the analysis over a period of one year, the presence of hypothyroidism did not increase the risk of patients having insulin resistance. The evolution towards clinical hypothyroidism and diabetes, respectively, did not have a significant effect on IR.

Although the general review of the data in the literature tends to favor the existence of a relationship between hypothyroidism and IR, we must mention that this hypothesis is based on observational studies. The advantage of our study is the design that allowed us to evaluate IR and

thyroid function over different periods of time. Also, the analysis of the samples by the same laboratory confers a uniformity of the data. The susceptibility to recall bias and information bias is low because we had direct access to the laboratory database.

We were able to adjust our multivariate analyzes for age, lipid profile, and treatment, but one of the limitations is the absence of other hormonal blood tests (control of other possible variables cannot be fully controlled as for all case-control studies). Also, the relatively small sample size could influence the results as well as the TSH value. It is possible that the relationship is evident only at higher TSH values.

In the second study (*Chapter 6*) there were no significant associations between vitamin D (25OHD) and IR. We observed a weak positive correlation between a higher level of 25OHD and an increase in HbA1c, HOMA-IR2 (peptide C), as well as a decrease in QUICKI. BMI had the strongest association with the response variables considered. Other modifiable or non-modifiable factors exceed the influence of 25OHD on IR in adult women with normal serum levels and may contribute to the rest of the observed variability. Supplementation is recommended in patients with vitamin D deficiency and further studies are needed to demonstrate pleiotropic effects in real-life cohorts that frequently have associated endocrine diseases.

I hypothesized that pro-inflammatory status induced by obesity through adipocyte hypertrophy and excess free fatty acids, associated or not with hypothyroidism, translates into increased secretion of chemokines. Therefore, an observational cross-sectional study was conducted (*Chapter 7*), that included patients presented consecutively for nutritional assessment in an outpatient diabetes clinic. From the correlation analysis we obtained a significant positive association between all HOMA-IR indices and C reactive protein (PCR), ferritin. Insulin-derived HOMA-IR better identifies cases of IR compared to other indices. In patients with subclinical hypothyroidism, HOMA-IR 1 and 2 (insulin) correlated positively with I-TAC. This group of patients also had higher median IL-8 values, similar to the group with early diabetes.

Attempting to model HOMA-IR1 and 2 (insulin) based on chemokines (IL-8, I-TAC, IP-10, leptin), the presence or absence of subclinical hypothyroidism and PCR, taking into account

age, BMI, abdominal circumference, glycated hemoglobin, and ATPO identified a single chemokine that was statistically significantly associated with the dependent variable (IL-8), but with a negligible, clinically insignificant effect. Studies that include a larger number of patients are needed to demonstrate whether IL-8 has been increased by chance in our population, and whether there is a common mechanism in both pathologies, or an independent one.

Sensitivity/Resistance indices to thyroid hormones, TSHI and TT4RI are inversely correlated with serum resistin, therefore the possible role of this chemokine, along with leptin, should be further investigated. A higher increase in I-TAC, leptin, and resistin levels in particular could lead to decreased sensitivity to thyroid hormones, as well as a faster increase in insulin resistance compared to the population of euthyroid obese women.

Also, in my doctoral studies, I participated in the UEFISCDI, PNCDI III, PN-III-P4-ID-PCE-2016-0120 research project, which aimed to develop stochastic sensors in the early diagnosis of diabetes. Subsequently, in an experimental study that followed I participated in the development of a stochastic sensor designed for the detection of fractalkine (one of the chemokines used in the third study) in patients with prediabetes, diabetes and obesity (*Chapter 8*). We chose this analyte because it had the highest median concentration in the group of patients with prediabetes.

Personal Contributions (*Chapter 9*)

In the field of epidemiological studies on the Romanian population: I described the prevalence of insulin resistance and thyroid pathologies; I described the relationship between thyroid function and insulin resistance (I contributed with an ISI indexed journal publication); I described the relationship between 25 hydroxy vitamin D and insulin resistance (I contributed with an ISI indexed journal publication).

In the field of studying biomarkers with a role in insulin resistance: I described the role of chemokines in the appearance of insulin resistance in patients with thyroid pathology; I have contributed to the development of a new method of determination using stochastic fractalkine sensors in patients with prediabetes, diabetes, and obesity.

Bibliography

Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Buonamano A, Ferrannini E, Serio M. High levels of circulating CXC chemokine ligand 10 are associated with chronic autoimmune thyroiditis and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5496-5499, 2004.

Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Paolicchi A, Ferrannini E, Serio M. Increase of interferon-gamma inducible alpha chemokine CXCL10 but not beta chemokine CCL2 serum levels in chronic autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol.* 152(2):171-7, 2005.

Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. Increase of interferon- γ inducible CXCL9 and CXCL11 serum levels in patients with active Graves' disease and modulation by methimazole therapy. *Thyroid.* 23(11):1461-9, 2013.

Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 13(3):272-80, 2014.

Aoki Y, Belin RM, Clickner R, Jeffries R, Phillips L, Mahaffey KR. Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002). *Thyroid.* 17(12):1211-23, 2007.

Baldane S, Ipekci SH, Ekin A, Abusoglu S, Unlu A, Kebapcilar L. Evaluation of fractalkine (FKN) and secreted frizzled-related protein 4 (SFRP-4) serum levels in patients with prediabetes and type 2 diabetes. *Bratisl Lek Listy.* 119(2):112–115, 2018.

Ferrannini E, Iervasi G, Cobb J, Ndreu R, Nannipieri M. Insulin resistance and normal thyroid hormone levels: prospective study and metabolomic analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 312(5):E429–E436, 2017.

Institutul Național de Statistică -https://www.thyroidaware.com/content/dam/web/health-care/biopharma/thyroidweek/ITAW_105_190mm_002.pdf și <https://raportuldegarda.ro/tiroida-la-control-bolile-tiroidiene-foarte-frecvente-in-romania/> (Accesed 09.01.2021)

Laclaustra M, Moreno-Franco B, Lou-Bonafonte JM, et al. Impaired sensitivity to thyroid hormones is associated with diabetes and metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 42:303–10, 2019.

Popa S, Mota M, Popa A, Mota E, Timar R, Serafinceanu C, Cheta D, Graur M, Hancu N. Prevalence of dyslipidemia and its association with cardiometabolic factors and kidney

function in the adult Romanian population: The PREDATORR study. *Diabetes Metab Syndr.* 13(1):596-602, 2019.

Răcățăianu N, Leach N, Bondor CI, Mârza S, Moga D, Valea A, and Ghervan C. Thyroid disorders in obese patients. Does insulin resistance make a difference? *Arch Endocrinol Metab* 61:575-583, 2017.

Shah JH, Motto GS, Papagiannes E, Williams GA. Insulin metabolism in hypothyroidism. *Diabetes.* 24(10):922-5, 1975.

Stefan-van Staden RI, Gugoasa LA, Biris AR. Pattern recognition of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in whole blood samples using new platforms based on nanostructured materials. *Nanoscale.* 7(36):14848–14853, 2015.

List with published articles related to PhD thesis subject

Stoica RA, Guja C, Pantea-Stoian A, van Staden RI, Popa-Tudor I, Ștefan SD, Ancuceanu R, Serafinceanu C, Ionescu Tîrgoviște C. No Association between 25-Hydroxyvitamin D and Insulin Resistance or Thyroid Hormone Concentrations in a Romanian Observational Study. *Medicina (Kaunas)*. 2020 Dec 30;57(1):25. doi: 10.3390/medicina57010025. **(IF-1.2)**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33396784/>

Stoica RA, Ancuceanu R, Costache A, Ștefan SD, Stoian AP, Guja C, van Staden RI, Popa-Tudor I, Serafinceanu C, Ionescu-Tîrgoviște C. Subclinical hypothyroidism has no association with insulin resistance indices in adult females: A case-control study. *Exp Ther Med*. 2021 Sep;22(3):1033. doi: 10.3892/etm.2021.10465. **(IF-1.7)**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34373719/>