

MEMORIU ȘTIINȚIFIC PENTRU SUSȚINEREA DOCTORATULUI

Titlul tezei: ROLUL NON-CODING RNA ÎN DIAGNOSTICUL TULBURĂRII
DEPRESIVE MAJORE

Doctorand: Cătălin Flavius Prodan-Bărbulescu

Coordonator științific: Prof. Univ. Dr. Edward-Paul Șeclăman

Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” din Timișoara

I. INTRODUCERE

Tulburarea depresivă majoră (TDM) este o problemă de sănătate globală, caracterizată printr-o simptomatologie variabilă, cu impact funcțional semnificativ. Tendința actuală în medicină este orientată spre medicina moleculară personalizată, care identifică particularitățile fiecărui individ afectat de o anumită patologie și direcționează eforturile colective către crearea de noi compuși pentru neutralizarea sau corectarea tulburărilor existente.

Din punct de vedere clinic, TDM este o tulburare psihiatrică care necesită cel puțin cinci simptome pe parcursul unei perioade de două săptămâni, dintre care cel puțin unul este: dispoziția depresivă, pierderea plăcerii sau a interesului. Aceste simptome trebuie să provoace suferință semnificativă din punct de vedere clinic sau să afecteze funcționarea socială, profesională sau alte domenii importante de funcționare și nu trebuie să poată fi atribuite altor afecțiuni medicale consumului de medicamente sau abuzul de anumite substanțe toxice. DSM 5-TR precizează, de asemenea, că trebuie excluse criteriile pentru un episod de manie sau hipomanie în vederea excluderii unei tulburări bipolare.

miRNA-urile, acizi ribonucleici mici, non-codanți, monocatenari, sunt utilizați în prezent ca biomarkeri pentru diferite patologii organice și non-organice. Acești biomarkeri sunt deosebit de relevanți în TDM datorită variațiilor lor plasmatice care survin la pacienții depresivi. De exemplu, este bine cunoscută variația lui hsa-miR-132 și hsa-miR-124, la pacienții TDM fiind asociate cu fenomenele de neuroinflamație și plasticitate sinaptică. Aceste entități reprezintă o *țintă* datorită stabilității lor, detectării simple, accesibile și necostisitoare, și expresiei specifice patologiei.

Exceptând sfera diagnosticului, miRNA-urile sunt deosebit de atractive în cercetare

și din prisma posibilității aplicării unor terapii țintite anti-miRNA.

II. OBIECTIVELE CERCETĂRII

În cadrul acestui studiu am avut ca obiective: identificarea și evaluarea unor miRNA-uri, ca biomarkeri plasmatici în rândul pacienților depresivi. Argumentele care stau la baza acestor obiective sunt: identificarea unor biomarkeri utili în diagnosticul paraclinic al depresiei, utilizarea acestor biomarkeri în vederea urmăririi post-terapeutice a pacienților depresivi, ajustarea tratamentului în funcție de variațiile plasmatice ale acestora.

III. MOTIVATIA ALEGERII TEMEI

Tulburarea depresivă majoră (TDM) este una dintre cele mai frecvente și invalidante afecțiuni psihiatrice la nivel global, având un impact profund asupra funcționării sociale și profesionale a individului. Diagnosticarea sa se bazează în prezent exclusiv pe criterii clinice, ceea ce poate conduce la subdiagnosticare sau diagnostic întârziat. În acest context, devine imperativă identificarea unor **biomarkeri moleculari obiectivi** care să susțină diagnosticul precoce și personalizat. miRNA-urile (miRNA) și ARN-urile necodante (ncRNA) reprezintă candidați ideali, datorită expresiei specifice, stabilității biologice și potențialului lor de a reflecta modificările neurobiologice subtile caracteristice TDM. Această cercetare își propune să aducă o contribuție semnificativă în direcția dezvoltării unui model molecular de diagnostic pentru TDM.

IV. EVOLUTIA CERCETĂRII

Cercetarea a debutat în anul 2022 cu elaborarea protocolului de studiu și aprobarea acestuia de către Comisia de Etică a UMF „Victor Babeș” Timișoara. Ulterior, au fost selectați pacienții și grupul de control conform criteriilor DSM, fiind efectuate prelevările de probe biologice și izolarea ARN. Analiza expresiei miRNA a fost realizată în laborator prin tehnici de qPCR, iar interpretarea a fost completată cu metode bioinformatică moderne. Activitatea științifică a fost derulată etapizat și susținută prin comunicări și publicații internaționale.

V. MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul de față a inclus 10 pacienți cu tulburare depresivă majoră (MDD) și 8 subiecți sănătoși din grupul de control. Participanții au fost pacienți ai Clinicii „Eduard Pamfil” din Timișoara, din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara. Participanții au îndeplinit criteriile de diagnostic pentru un episod depresiv major, enumerate în Manualul de Diagnostic și Statistică al Tulburărilor Mentale, anula a cincea (DSM-V).

Probele de sânge au fost colectate folosind EDTA, iar plasma a fost separată prin centrifugare și stocată la -80°C până la utilizarea ulterioară. ARN-ul total care conține miRNA a fost extras folosind kitul miRNeasy Serum / Plasma, inclusiv C. elegans miR-39 mimic spike in și UniSp2, 4 și 5 ca un control intern pentru normalizare, în conformitate cu recomandările producătorului.

Expresia miRNA matur a fost determinată utilizând qPCR în timp real, folosind un sistem ABI 7900HT și utilizând un panou de miRNA de profil miRNA miRCURY LNA miRNA. Datele qPCR au fost analizate prin utilizarea QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center.

Analiza statistică a fost efectuată prin analizarea valorilor medii ale probelor și determinând semnificația rezultatelor. Valorile au fost calculate pe baza unui test t-pereche pentru semnificație statistică. Fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) este expresia normalizată a unui miRNA ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) în test, în timp ce valorile p au fost calculate pe baza unui test Student pentru valorile Δ replicate la 2-3 CT pentru fiecare genă în grupurile de control și tratament.

VI. REZULTATE

În materie de rezultate, panelul este format din aproximativ 30 de biomarkeri obținuți din studiul a două grupuri de populație pe grupuri TDM, aliniați cu literatura de specialitate prin două articole originale publicate în reviste internaționale. Dintre acești biomarkeri, este esențial să fie citați cei care au exprimat cele mai semnificative variații plasmatice la pacienții depresivi, inclusiv **hsa-miR-874-3p**, **hsa-miR-574-3p**, **hsa-miR-93-3p**, **hsa-miR-93-3p**, **hsa-let-7d-5p**, **hsa-mir-532-3p**, **hsa-mir-532-5p**, **hsa-mir-339-**

5p și hsa-mir-18b-5p.

În primul studiu, am obținut un set de miRNA-uri, reprezentat în principal de **hsa-miR 874-3p, hsa-let-7d-5p și hsa-miR-93-3p**, care prezintă o creștere semnificativă a nivelelor plasmatică la pacienții cu TDM în cadrul grupului de studiu. Aceste constatări evidențiază potențialul **hsa-miR-874-3p, hsa-let-7d-5p și hsa-miR-93-3p** ca biomarkeri plasmatici veritabili pentru TDM, sugerând rolul lor pivot în fiziopatologia acestei tulburări.

Rezultatele studiului subliniază necesitatea standardizării protocoalelor pentru încorporarea acestor miRNA-uri în practica clinică, relevând utilitatea potențială a acestora atât în diagnosticarea, cât și în urmărirea terapeutică a pacienților cu TDM. O astfel de standardizare ar putea deschide calea pentru abordări mai precise și personalizate în ceea ce privește gestionarea TDM, îmbunătățind, în cele din urmă, rezultatele pacienților.

În cel de-al doilea studiu, am decelat multiple variații semnificative ale profilurilor de expresie miRNA în rândul pacienților TDM. În mod specific, am identificat 15 miRNA-uri cu variații notabile, dintre care mai multe au prezentat modificări substanțiale ale FR și niveluri plasmatică crescute la pacienții cu TDM. Aceste constatări evidențiază potențialul acestor miRNA-uri ca biomarkeri de diagnostic promițători pentru TDM.

Cele mai reprezentative miRNA-uri din studiul efectuat sunt: **hsa-miR-532-5p, hsa-miR 532-3p și hsa-miR-339-5p**, fiind enumerate în ordinea lor descrescătoare. Caracterul înalt variabil al acestor miRNA-uri m-a condus spre ideea de a crea un *clasament* al acestora, care să releve importanța lor funcțională.

VII. DISCUȚII

În urma unei revizuii a literaturii de specialitate, am identificat mai multe corelații semnificative cu studiul nostru. De exemplu, hsa-miR-93-3p, un miRNA care a arătat variații semnificative în studiul nostru, a fost investigat și în studiul condus de Homorogan et al. ca biomarker al TDM.

hsa-miR-93-3p este codificat de o genă situată pe cromozomul 7q221. Se co-transcrie cu gena gazdei minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7) și este exprimată în nucleu. Acesta aparține clusterului pro-oncogen miRNA-106b-25 și este un paralog al clusterului miRNA-17-92.

S-a demonstrat că acest cluster controlează expresia unui număr de gene țintă legate de funcții fiziologice critice, cum ar fi angiogeneza, apoptoza și diviziunea celulară. În plus, studiul efectuat de Liu X. și colab. a evidențiat rolul hsa-miR-93-3p alături de miR-101 ca biomarkeri pentru diagnosticarea tulburării depresive majore.

Următorul miRNA care primește „atenția” acestui studiu este hsa-miR-874-3p, care este în mod clar supraexprimat în grupul TDM, având valoare de diagnostic considerabilă în tulburarea depresivă majoră.

Conform literaturii științifice, se știe că hsa-miR-874 este localizat pe cromozomul 5q31.2, jucând un rol important nu doar în depresie, ci și în bolile maligne (carcinom hepatocelular, adenocarcinom ductal pancreatic, cancer ovarian epitelial, cancer mamar, cancer colorectal, cancer gastric) și boli non-maligne (boală cardiacă ischemică, infarct miocardic acut, nefropatie diabetică și sindrom ovarian polichistic) (78,79). Conform studiului efectuat de Zhang et al., există multe gene țintă miRNA-874 și, prin inhibarea expresiei acestor gene țintă, miR-874 este implicat în proliferarea celulară, apoptoză, migrare, invazie, ciclul celular și tranziție epitelial-mezenchimală.

miRNA let-7 (let-7) este unul dintre primele miRNA identificate și caracterizate care exercită multiple roluri biologice, fiind implicat în mai multe procese fiziologice care includ modularea semnalului, reglarea temporală, ubicuitarea proteinelor, identitatea sexuală și proliferarea și diferențierea celulară (75). Revenind la domeniul neurobiologiei și neuropsihiatriei, mai semnificativ, genele miR ale familiei let-7 sunt exprimate la nivelul întregului creier și sunt asociate cu o serie de procese neuropsihologice, inclusiv dispoziție și comportamente afective, precum și cu multiple tulburări psihice, cum ar fi anxietatea, depresia, schizofrenia și dependența de cocaină.

În studiul efectuat de Maffioletti et al., prezența hsa-miR-let-7d-5p ca biomarker de diagnostic în tulburarea depresivă majoră este accentuată prin evidențierea supraexprimării acestuia în plasma pacienților cu tulburare depresivă majoră.

Acest studiu are unele limitări care își justifică recunoașterea: dimensiunea redusă a eșantionului și lipsa includerii unor subtipuri specifice ale TDM. În primul rând, a fost efectuat pe un grup relativ mic, format din zece pacienți diagnosticați cu TDM și opt subiecți sănătoși de control. În al doilea rând, acest studiu nu a inclus subtipuri specifice

TDM (de exemplu tulburare depresivă majoră cu elemente psihotice sau tulburare depresivă majoră cu elemente melancolice), limitând clasificarea rezultatelor în categorii largi de tulburări depresive majore.

VIII. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

În concluzie, depresia este o interacțiune complexă de factori biologici, psihologici și de mediu, fiind asemenea unui „balet” de neurotransmițători perturbații, predispoziții genetice și experiențe trăite.

În mod specific, contribuția mea în cadrul acestei teme vaste, complexe și intens dezbătute constă în identificarea a două seturi de miRNA-uri, care au exprimat variații semnificative statistic, în cadrul lotului TDM comparativ cu lotul martor și care aspiră la rolul de biomarkeri plasmatici pentru pacienții depresivi.

Cele mai relevante miRNA-uri care aparțin acestor seturi sunt: **hsa-miR 874-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR 532-3p și hsa-miR-339-5p**. Importanța miRNA-urilor enumerate este dată de semnificația statistică pe care am obținut-o în cazul acestor miRNA-uri, mai exact de cele mai reprezentative valori p și FR. Astfel că, aceste constatări evidențiază potențialul lor de biomarkeri plasmatici veritabili pentru TDM, sugerând rolul lor pivot în fiziopatologia acestei tulburări.

IX. APRECIEREA COORDONATORULUI DE DOCTORAT

Cercetarea doctorală s-a concretizat prin publicarea a 3 lucrări de specialitate în reviste cu factor de impact cuprins între 2.8 și 3.9. Subiectul abordat este unul de înalt interes medical dat fiind faptul că aproximativ 5% din populația României suferă de boala depresivă majoră.

Complexitatea temei abordate, modul de prezentare și contribuțiile originale mă determină să apreciez că teza de doctorat “ROLUL NON-CODING RNA ÎN DIAGNOSTICUL TULBURĂRII DEPRESIVE MAJORE” a doctorandului Cătălin Prodan-Bărbulescu, îndeplinește toate cerințele pentru a fi susținută în ședință publică.

X. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Edward Paul Șeclăman, Virgil Enătescu, Ionuț Flaviu Faur, Laura Andreea Ghenciu, Paul Tuțac, Paul Pașca, and Laura Octavia Grigoriță. 2024. "Evaluating the Connection between MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs for the Establishment of the Major Depressive Disorder Diagnosis" *Biomedicines* 12, no. 3: 516.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12030516>
2. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Cristian Daniel Alin, Ionuț Flaviu Faur, Georgeta Cristiana Bujor, Edward Paul Șeclăman, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Dănilă, Ecaterina Dăescu, Rami Hajjar, Laura Andreea Ghenciu, and et al. 2024. "Identification of Specific Plasma miRNAs as Potential Biomarkers for Major Depressive Disorder" *Biomedicines* 12, no. 10: 2165.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12102165>
3. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Laura Andreea Ghenciu, Edward Șeclăman, Georgeta Cristiana Bujor, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Danila, Ecaterina Dăescu, Luminioara Maria Rosu, Ionuț Flaviu Faur, Paul Tuțac, and et al. 2024. "Exploring miRNA Biomarkers in Major Depressive Disorder: A Molecular Medicine Perspective" *Current Issues in Molecular Biology* 46, no. 10: 10846-10853.
IF: 2,8
<https://doi.org/10.3390/cimb46100644>