

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA**  
**FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ**  
**Departamentul IV BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE**

**MOATĂR ALEXANDRA IOANA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**EXPRESIILE PLASMATICE TIMPURII ALE HAS-MICROARN-195-5P  
ȘI HB-EGF PREZIC SEVERITATEA BOLII COVID-19 LA PACIENȚII  
SPITALIZAȚI**

## **R E Z U M A T**

**Conducător de doctorat:**

**PROF.UNIV.DR.SÎRBU IOAN-OVIDIU**

**Timișoara**

**2024**



## REZUMAT

Infecția cu virusul SARS-CoV-2 a fost cea de-a treia infecție cu coronavirus cu răspândire largă în secolul 21 [1]. Cunoscută deasemenea sub numele de boala COVID-19, infecția a debutat la finalul anului 2019 și în scurt timp s-a răspândit la nivel global, surclasând epidemiile precedente cu coronavirus și anume SARS-CoV-1 în 2002 și MERS-CoV în 2012 în ceea ce privește numărul de cazuri infectate [2]. Totuși, spre deosebire de infecțiile precedente, rata riscurilor fatale a infecțiilor cu virusul SARS-CoV-2 (2-4%) [3], s-a dovedit a fi mai scăzută decât în cazul infecțiilor cu virusul SARS-CoV-1 (11%) [4] și a infecțiilor cu virusul MERS-CoV (35%) [5]. Pe de altă parte, la pacienții din grupuri de risc, înaintați în vârstă și cu comorbidități asociate, s-a remarcat deasemenea o rată crescută a mortalității de până la 35% [6].

Boala COVID-19 se manifestă ca o patologie complexă ce se dezvoltă în mai multe organe datorită expresiei semi-ubicultare a receptorului celular ACE (enzima de conversie a angiotensinei 1 în angiotensina 2), prin care virusul intră în mediul intracelular în diverse țesuturi [7]. Boala poate progresa spre forme mai severe la aproximativ 6.4% dintre pacienții infectați de peste 60 de ani și la până 18% la pacienții cu vârsta de peste 80 de ani [8]. Tabloul patogenetic complet factorilor de risc care pot promova o evoluție severă a bolii este încă necunoscut. Până în prezent, se cunoaște că factorii de risc care promovează instalarea unei forme severe de boală au legătură în primul rând cu dereglări ale statusului imunitar și secundar au legătură cu diverse mecanisme patogenetice specifice virusului sau gazdei alterat datorită infecției. Printre factorii patogenetici ai gazdei care se dereglează în urma infecției virale, totalitatea speciilor microARN [9] și a factorilor de creștere celulari [10], joacă roluri importante. Între moleculele microARN și factorii de creștere se găsește o relație bidirecțională. Astfel, moleculele microARN pot modula expresiile variatelor proteine care sunt implicate în căile de semnalizare a factorilor de creștere, în timp ce, factorii de creștere la rândul lor, pot regla biosinteza moleculelor microARN. Aceste conexiuni, crează rețele de semnalizare dense care pot modula procese în general afectate de infecția virală cum ar fi ciclul celular și apoptoza [11]. De aceea, este deductibil, ca dereglări ale expresiei moleculelor microARN și a factorilor de creștere celulari ca urmare a infecției cu virusul SARS-CoV-2 să favorizeze dezvoltarea unor forme severe de boală la pacienții din categoria de risc.

În prima parte a studiului de față, am identificat răspunsul biologic al expresiilor moleculelor microARN la infecția virală și am caracterizat din punct de vedere funcțional genele țintă ale speciilor microARN care au fost dereglate în această patologie în cinci tipuri de țesuturi, frecvent afectate de infecția virală. Rezultatele rețelelor de gene afectate din inimă, plămâni, țesut limfatic și rinichi au demonstrat că procese celulare precum respirația mitocondrială și căile de semnalizare ale receptorilor celulari sunt afectate de către moleculele microARN supra-exprimate. Iar moleculele microARN sub-exprimate ca urmare a infecției virale, impactează gene implicate în procese precum ciclul celular mitotic în țesuturi precum inimă, plămâni și rinichi [12].

În formele severe ale bolii COVID-19, răspunsul gazdei la infecție implică diverse mecanisme patogenetice precum: inflamația, furtuna citokinelor, tromboză, hipoxie și septicemie, procese adesea impactate și reglate specific de hsa-microARN-195-5p. De aceea în a doua parte a studiului de față, obiectivul a fost acela de a cuantifica expresia plasmatică a acestei molecule microARN prin tehnica cantitativă de revers-transcripție polimerizare în lanț în timp real, cunoscută prescurtat sub numele de qRT-PCR. Expresia plasmatică a acestei specii microARN a fost cuantificată la pacienții spitalizați și diagnosticați pozitiv cu boala COVID-19 în primele două zile de spitalizare. Rezultatele au demonstrat o expresie semnificativ scăzută la pacienții cu evoluție severă a bolii comparativ cu pacienții cu o formă ușoară și cu controlii. Nivelele scăzute ale acestei specii microARN au fost invers corelate cu ARN-emia virusului SARS-CoV-2 ale acelorași pacienți. De asemenea, rezultatele analizelor funcționale ale genelor țintă moleculei hsa-microARN-195-5p au demonstrat că respirația mitocondrială este procesul celular semnificativ impactat în celula musculară cardiacă [13].

În cea de-a treia parte a studiului de față, obiectivul a fost să analizăm expresia plasmatică a factorului de creștere HB-EGF, proteină țintă pentru hsa-microARN-195-5p utilizând tehnica ELISA de tip sandwich la pacienții cu COVID-19. Acest factor de creștere este implicat în procese celulare precum vindecarea leziunilor tisulare care apar în fazele acute ale bolii COVID-19 în țesuturi precum plămâni, ficat, inimă și rinichi. Rezultatele au arătat că nivelele plasmatice ale factorului HB-EGF au fost semnificativ crescute la pacienții cu forma severă a bolii comparativ cu formele moderate și controlii. Împreună cu alți factori de risc predictivi precum delta hsa-miR-195-5p, HB-EGF, fibrinogen, timpul de protrombină, D-Dimeri, și creatinina, am construit un model predictiv a riscului de a dezvolta o formă severă a bolii COVID-19. Modelul predictiv s-a caracterizat prin AUC (Area Under Curve) de 0.9556 și o valoare a indicelui C de 0.8137. Curba deciziei clinice se caracterizează printr-un efect clinic

net semnificativ crescut a modelului de risc predictional în comparație cu cele două cazuri extreme de non-screening sau screening complet al tuturor factorilor de risc. De aceea, putem concluziona că modelul de risc predicțional dezvoltat este de utilitate clinică [14].

În concluzie, studiul nostru arată că infecția cu virusul SARS-CoV-2 poate promova dereglări timpurii ale nivelelor plasmaticice ale factorului de creștere HB-EGF și hsa-microARN-195-5p. Ambele molecule au demonstrat prezența unei dinamici pe parcursul clinic al bolii în ceea ce privește severitatea acesteia, ceea ce le face relevante din punct de vedere clinic ca și posibili factori de risc predicționali pentru severitatea bolii COVID-19.

## Bibliografie

1. Pustake M, Tambolkar I, Giri P, Gandhi C. SARS, MERS and CoVID-19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features. *J Family Med Prim Care*. 2022 Jan; 11(1):10-17. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc\_839\_21.
2. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **19**, 141–154 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
3. Sorci G, Faivre B, Morand S. Explaining among-country variation in COVID-19 case fatality rate. *Sci Rep*. 2020 Nov 3;10(1):18909. doi: 10.1038/s41598-020-75848-2. PMID: 33144595; PMCID: PMC7609641.
4. Chan-Yeung M, Xu RH. SARS: epidemiology. *Respirology*. 2003 Nov;8 Suppl(Suppl 1):S9-14. doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x. PMID: 15018127; PMCID: PMC7169193.
5. World Health Organisation. 2019. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
6. Signorelli C, Odone A. Age-specific COVID-19 case-fatality rate: no evidence of changes over time. *Int J Public Health*. 2020 Nov;65(8):1435-1436. doi: 10.1007/s00038-020-01486-0. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32978645; PMCID: PMC7518649.
7. Zaim S, Chong JH, Sankaranarayanan V, Harky A. COVID-19 and Multiorgan Response. *Curr Probl Cardiol*. 2020 Aug;45(8):100618. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100618. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32439197; PMCID: PMC7187881.
8. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, Cuomo-Dannenburg G, Thompson H, Walker PGT, Fu H, Dighe A, Griffin JT, Baguelin M, Bhatia S, Boonyasiri A, Cori A, Cucunubá Z, FitzJohn R, Gaythorpe K, Green W, Hamlet A, Hinsley W, Laydon D, Nedjati-Gilani G, Riley S, van Elsland S, Volz E, Wang H, Wang Y, Xi X, Donnelly CA, Ghani AC, Ferguson NM. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):669-677. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30243-7. Epub 2020 Mar 30. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr 15; Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 May 4; PMID: 32240634; PMCID: PMC7158570.
9. Fernández-Pato A, Virseda-Berdices A, Resino S, Ryan P, Martínez-González O, Pérez-García F, Martín-Vicente M, Valle-Millares D, Brochado-Kith O, Blancas R, Martínez A, Ceballos FC, Bartolome-Sánchez S, Vidal-Alcántara EJ, Alonso D, Blanca-López N, Ramirez Martinez-Acitores I, Martín-Pedraza L, Jiménez-Sousa MÁ, Fernández-Rodríguez A. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerg Microbes Infect*. 2022 Dec;11(1):676-688. doi: 10.1080/22221751.2022.2038021. PMID: 35130828; PMCID: PMC8890551.

10. Xu, ZS., Shu, T., Kang, L. *et al.* Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 100 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0211-1>
11. Kedmi M, Sas-Chen A, Yarden Y. MicroRNAs and Growth Factors: An Alliance Propelling Tumor Progression. *J Clin Med*. 2015 Aug 13;4(8):1578-99. doi: 10.3390/jcm4081578. PMID: 26287249; PMCID: PMC4555078.
12. Moatar AI, Chis AR, Marian C, Sirbu IO. Gene network analysis of the transcriptome impact of SARS-CoV-2 interacting microRNAs in COVID-19 disease. *International journal of molecular sciences*. 2022 Aug 17;23(16):9239.
13. Moatar AI, Chis AR, Romanescu M, Ciordas PD, Nitusca D, Marian C, Oancea C, Sirbu IO. Plasma miR-195-5p predicts the severity of Covid-19 in hospitalized patients. *Scientific Reports*. 2023 Aug 23;13(1):13806.
14. Moatar AI, Chis AR, Nitusca D, Oancea C, Marian C, Sirbu IO. HB-EGF Plasmatic Level Contributes to the Development of Early Risk Prediction Nomogram for Severe COVID-19 Cases. *Biomedicines*. 2024 Feb 5;12(2):373.