
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Markeri genetici implicați în dezvoltarea comportamentului suicidar

Doctorand **Mihaela-Elvira Vușcan (căs. Cîmpianu)**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Horea-Vladi Matei**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Suicidul - considerații generale	17
1.1. Definiții, terminologie, generalități	17
1.2. Teorii ale suicidului	19
1.3. Epidemiologia suicidului	22
1.4. Statistica suicidului în România	26
2. Markerii genetici ai comportamentului suicidar	31
3. Considerații medico-legale	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1. Influența factorilor psihosociali și de mediu în dezvoltarea comportamentului suicidar	51
3.1. Introducere	51
3.2. Determinanți ai ideții de suicidare în populația României	53
3.2.1. Introducere	53
3.2.2. Obiective	56
3.2.3. Material și metodă	56
3.2.4. Rezultate	58
3.2.5. Discuții	61
3.2.6. Concluzii	64
3.3. Factori de risc în dezvoltarea comportamentului suicidar	65
3.3.1. Introducere	65
3.3.2. Obiective	67
3.3.3. Material și metodă	67
3.3.4. Rezultate	67
3.3.4.1. Probleme familiale și sociale	71
3.3.4.2. Probleme economice	71
3.3.4.3. Patologii psihiatrice	72
3.3.4.4. Patologii somatice	73
3.3.5. Discuții	73
3.3.6. Concluzii	77
3.4. Impactul pandemiei de COVID-19 asupra comportamentului suicidar în România	79
3.4.1. Introducere	79
3.4.2. Obiective	81
3.4.3. Material și metodă	81
3.4.4. Rezultate	82
3.4.5. Discuții	83
3.4.6. Concluzii	86

4. Studiul 2. Stabilirea asocierii comportamentului suicidar cu alelele HLA din clasa II	87
4.1. Introducere	87
4.2. Obiective	94
4.3. Material și metodă	94
4.4. Rezultate	96
4.5. Discuții	104
4.6. Concluzii	106
5. Studiul 3. Influența unor polimorfisme mononucleotidice asupra comportamentului suicidar	107
5.1. Introducere	107
5.2. Obiective	109
5.3. Material și metodă	109
5.4. Rezultate	112
5.5. Discuții	124
5.6. Concluzii	126
6. Concluzii generale	129
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	133
REFERINȚE	135
ANEXE	153
Anexa I. Corelații ale genotipurilor <i>DQB1</i> cu determinanți psihosociali la grupul de intervenție	153
Anexa II. Corelații ale genotipurilor <i>DRB1</i> cu determinanți psihosociali la grupul de intervenție	155

Cuvinte cheie:

sinucidere, comportament suicidar, idee suicidară, markeri genetici, ADN, COVID-19, HLA, SNP, SSP-PCR, RT-PCR

INTRODUCERE

Suicidul este o problemă de sănătate publică insuficient conștientizată, care afectează toate categoriile de vârstă din toate regiunile globului. În ciuda acumulării unui volum impresionant de cunoștințe, impactul factorilor care declanșează comportamentul suicidar nu este elucidat în suficientă măsură pentru a permite identificarea persoanelor care prezintă un risc iminent, în vederea implementării unor măsuri de prevenție eficiente, în acord cu obiectivele dezvoltării durabile și sustenabile trasate de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în conformitate cu Agenda 2030 a Organizației Națiunilor Unite (ONU). Prevenția fenomenului suicidar este o problemă de mare actualitate. Teza de doctorat își aduce contribuția la conștientizarea sinuciderii ca problemă majoră de sănătate publică.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Trecând în revistă etiologia și principalele teorii care au încercat să explice fenomenul suicidar, cercetarea din prezenta teză furnizează date comprehensive privind amploarea acestuia în România ultimelor decenii, vizând dimensiunile lui sociale și economice din perspectiva educației, sănătății și a protecției sociale.

Studiile au demonstrat că suicidul este rezultatul interacțiunii complexe a mai multor factori (genetici, psihologici, socio-economici, de mediu), adesea asociate unor afecțiuni psihice (în special depresia), pe fondul consumului de alcool și/sau de droguri. Deși numeroase cercetări au raportat o transmitere ereditară de până la 50%, meta-analizele sau studii de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) nu au evidențiat o variantă genetică comună asociată cu spectrul comportamentului suicidar. Cercetările din ultimele decenii au conturat relevanța factorilor biologici în complexul determinanților comportamentului suicidar, folosind diverse abordări pentru a identifica markeri asociați cu vulnerabilitatea la sinucidere. Cele mai promițătoare rezultate privesc sistemul neurotransmițătorilor, axa hipotalamo-hipofizo-suprarenală (HPA), markerii neuroinflamatori, factorii neurotrofici și lipoproteinele. Teoriile moderne încearcă să combine aspectele neurobiologice cu ipoteze sociologice (relația dintre personalitatea individului și factorii de stres sociali sau de mediu), în scopul dezvoltării unui model integrat care vizează găsirea unui set de indicatori biologici și comportamentali care ar putea ajuta la identificarea persoanelor cu risc suicidar crescut.

În prezenta teză de doctorat am identificat diferite corelații între suicid, comportamentul suicidar, afecțiuni psihice asociate și o serie de markeri genetici responsabili pentru declanșarea acestora, în baza unor studii efectuate pe un eșantion populațional din Transilvania, cu concursul unor instituții psihiatrice și de medicină legală din Cluj-Napoca, investigând totodată impactul factorilor psihosociale și de mediu în favorizarea apariției ideății suicidare și în declanșarea comportamentului suicidar, inclusiv în contextul pandemiei de COVID-19.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

OBIECTIVE

Identificarea și evaluarea factorilor de risc pentru apariția ideeației suicidare și declanșarea comportamentului suicidar în contextul cultural românesc, pe fondul pandemiei de COVID-19, au constituit un obiectiv important al tezei.

Pornind de la premisa că identificarea persoanelor care se confruntă cu idei și comportamente suicidare este un element-cheie al strategiilor de prevenție, primul studiu a urmărit să evidențieze influența factorilor psihosociali și de mediu în dezvoltarea comportamentului suicidar. O primă linie de cercetare a urmărit să stabilească asocieri între existența unor idei obsesive sau stări de tristețe îndelungată și indicatori ai calității vieții sau antecedente de viață adverse, o a doua completând datele socio-demografice și clinice obținute cu interviuri narative ale subiecților privind percepția post-factum a experiențelor personale legate de comportamentul suicidar, conturând tabloul persoanelor cu risc de a dezvolta un astfel de comportament. O a treia linie de cercetare a primului studiu a trecut în revistă impactul pe plan național și internațional al pandemiei de COVID-19 asupra comportamentului suicidar, analizând comparativ cazuistica tentativelor de sinucidere înregistrate la Spitalul Clinic Județean de Urgență (SCJU) Cluj înainte și în timpul pandemiei.

Obiectivul major al prezentei teze de doctorat a vizat stabilirea unor noi corelații între suicid, comportamentul suicidar sau afecțiuni psihice asociate și o serie de markeri genetici responsabili pentru declanșarea acestora în baza unor studii pe un eșantion din Transilvania, cu concursul unor instituții psihiatrice și de medicină legală din Cluj-Napoca. Pornind de la premisa că dezvoltarea unui comportament suicidar este condiționată de interacțiunea complexă a mai multor gene cu factori psihosociali și de mediu, s-au selectat câteva gene candidate sugerate de studiile de specialitate. Conținând cel mai polimorf grup de gene din întregul genom uman, complexul major de histocompatibilitate uman a fost intens cercetat datorită implicării genelor sistemului antigen leucocitar uman (*HLA*) în patogeneza diferitelor boli psihice. Obiectivul celui de-al doilea studiu al tezei a fost de a identifica alelele, genotipurile și haplotipurile *HLA-DQB1* și *HLA-DRB1* susceptibile de a influența comportamentul suicidar pe un eșantion din Transilvania.

Cele mai frecvente mutații la nivelul genomului uman, polimorfismele mononucleotidice (SNP) sunt markeri valoroși pentru înțelegerea bazelor moleculare ale diferitelor afecțiuni, conservarea lor în perioada evoluției speciei permițând asocierea modificărilor la nivelul secvențelor de ADN cu diferite schimbări fenotipice. O multitudine de studii au asociat suicidul cu dereglarea unor procese biologice, disfuncții de natură serotoninergică, noradrenergică, dopaminergică sau glutamatergică la nivelul axei HPA fiind des invocate în acest context. Din această perspectivă, al treilea studiu s-a axat pe identificarea unor polimorfisme specifice pacienților cu tentative de suicid internați la Clinica de Psihiatrie a SCJU Cluj și a decedaților cu suicid finalizat autopsiați la Institutul de Medicină Legală (IML) din Cluj-Napoca, obținute prin genotiparea unor SNP-uri frecvent asociate suicidului în cercetări similare: rs110402 (gena *CRHR1*), rs3800373 (gena *FKBP5*) și rs2289656 (gena *NTRK2*).

METODOLOGIE GENERALĂ

În vederea atingerii obiectivelor cercetării am conceput un chestionar care să permită colectarea datelor demografice și socio-economice, acesta acoperind și aspecte de interes privind calitatea vieții (scale Likert), diagnosticul psihiatric (conform ICD-10), istoric de suicid în

familie, antecedentele heredo-colaterale (din fișele medicale) și dimensiunea singurătății socio-emoționale (scala scurtă De Jong Gierveld/Van Tilburg).

Urmărind identificarea factorilor care favorizează dezvoltarea ideății suicidare pe fondul unor stări depresive, în contextul singurătății socio-emoționale influențate de izolarea socială, chestionarul a fost administrat unui număr de 1102 persoane în vârstă de minim 18 ani, folosindu-se metoda interviurilor telefonice asistate de calculator. Scenariul utilizat de operatorii de interviu a inclus informații legate de confidențialitate, anonim și politica de protecție a datelor, precum și obținerea unui consimțământ informat exprimat verbal. În interpretarea datelor acestui studiu, cu un design transversal de cercetare cantitativă, s-au folosit proceduri de statistică descriptivă, inferențială și analiză multivariată. Au fost aplicate testul de corelație Pearson și regresia logistică binară folosind programul SPSS.

A doua linie de cercetare a studiului sociologic a folosit un design mixt, bazat atât pe o investigație cantitativă - prin administrarea chestionarului de cercetare amintit și a unei baterii de teste (Inventarul depresiei Beck II, Scala Columbia de evaluare a severității riscului suicidar), cât și pe o anchetă calitativă derulată în mediu clinic. Un număr de 70 pacienți psihiatrici au participat voluntar la un interviu narativ, împărtășindu-și experiențele legate de episodul suicidar. Transcrierile interviurilor acestora au fost completate cu informații din fișele medicale ale pacienților. Datele cantitative au fost analizate cu Programul SPSS, pentru cele calitative fiind folosită analiza tematică.

A treia linie de cercetare a primului studiu a apelat la un design observațional-descriptiv, analizând retrospectiv tentativele de sinucidere, cu sau fără diagnostice psihiatrice, conform Clasificării Internaționale a Bolilor, ediția a 10-a (ICD-10), înregistrate înainte și în timpul pandemiei de COVID-19 la SCJU Cluj, precum și rapoartele IML Cluj-Napoca în cazul sinuciderilor finalizate. Pentru analiza datelor s-a folosit programul SPSS.

Studiile genetice au vizat asocierea comportamentului suicidar și a ideății suicidare cu alelele HLA de clasa II (studiul 2), respectiv cu polimorfismele mononucleotidice rs110402 (gena *CRHR1*), rs2289656 (gena *NTRK2*) și rs3800373 (gena *FKBP5*) - în al treilea studiu. Acestea au implicat un lot de studiu compus din 196 persoane. Lotul experimental a inclus 70 de pacienți ai Clinicii de Psihiatrie din cadrul SCJU Cluj și 28 de cazuri de sinucideri finalizate înregistrate la IML Cluj-Napoca, lotul de control fiind alcătuit din 98 de persoane fără antecedente suicidare, care au fost supuse testării ADN de paternitate în Laboratorul de Biologie Moleculară al IML Cluj-Napoca. Nu au existat relații de rudenie între grupurile caz-control și nici în cadrul grupurilor.

Subiecților li s-a administrat chestionarul de cercetare și li s-au recoltat probe biologice, în baza acordului informat de testare genetică al subiecților, sau, în cazul persoanelor decedate, de la aparținătorii acestora. Probele de sânge venos au fost recoltate în vacuete cu EDTA, ADN-ul genomic fiind extras și purificat cu kituri comerciale. Toate analizele moleculare s-au efectuat în laboratoarele Disciplinei de Biologie Celulară și Moleculară a Facultății de Medicină din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” (UMFIH).

Pentru tiparea HLA s-a apelat la reacția PCR cu primer specific de secvență (SSP-PCR), folosindu-se două variante: una cu kituri HLA-ReadyGene DQ și HLA-Ready Gene DR, urmate de electroforeza produșilor PCR în gel de agaroză marcat cu bromură de etidiu și vizualizare ulterioară la un transiluminator, și o a doua cu kituri HLA-FluoGene DRDQ, cu detectarea automată a fluorescenței finale post-PCR la analizorul FluoVista. Tabelele de date au fost generate folosind aplicația Microsoft Excel. Pentru analiza statistică s-a utilizat software-ul Epi Info™. Pragul de semnificație statistică *p* a fost stabilit la 0,05.

În cazul SNP-urilor s-au folosit kituri TaqMan® Genotyping, amplificarea făcându-se cu primeri specifici pentru fiecare SNP analizat. Datele primare au fost obținute folosind HID Real-Time PCR Analysis Software.

Pentru toate protocoalele și procedurile de studiu implicând subiecți umani au fost obținute aprobări de la Comisiile de Etică ale UMFIIH, IML Cluj-Napoca și SCJU Cluj. Toate cercetările s-au derulat cu respectarea principiilor etice și a confidențialității datelor personale ale subiecților.

REZULTATE

STUDIUL 1: Influența factorilor psihosociali și de mediu în dezvoltarea comportamentului suicidar

Explorând prezența ideății suicidare și a tristeții prelungite în relație cu factorii psihosociali, calitatea vieții și antecedente de viață adverse pe un eșantion reprezentativ pentru populația României, am stabilit că un nivel scăzut al dimensiunilor psihosociale și de calitate a vieții, precum și existența unor antecedente de viață adverse, cresc riscul apariției ideății suicidare și a tristeții prelungite în populația generală, creionând următorul profil al persoanelor care au experimentat ideăția suicidară: adult tânăr sau de vârstă mijlocie, cu un nivel scăzut de educație și o stare de fericire generală redusă, care a experimentat episoade de depresie, autovătămare și traumă. S-a constatat că ideăția suicidară este independentă de gen și de zona de reședință. Studiul a confirmat că sinuciderea și ideăția suicidară sunt probleme complexe, cele mai frecvente motive oferite pentru o tentativă de sinucidere fiind conflictele familiale, asociate sau nu consumului de alcool, adesea pe fondul unei personalități impulsive. Cercetarea a evidențiat trăsăturile socio-demografice și clinice ce caracterizează pacienții psihiatrici cu antecedente de comportament suicidar, reliefând principalii factori de risc care precipită manifestarea unui astfel de comportament, în baza informațiilor culese imediat după episoadele de tentativă de suicid. Evaluând rata sinuciderilor în timpul pandemiei de COVID-19 comparativ cu anii precedenți în România, datele obținute sugerează că aceasta a avut un impact asupra sănătății mintale a populației generale, incitând la comportamente suicidare pe fondul izolării sociale ca urmare a măsurilor guvernamentale impuse pentru prevenirea răspândirii infectării cu virusul SARS-CoV-2.

STUDIUL 2: Stabilirea asocierii comportamentului suicidar cu alelele HLA din clasa II

Obiectivul major al tezei a vizat stabilirea unor corelații între suicid și o serie de markeri genetici responsabili pentru declanșarea acestuia. În studiul 2 am identificat alelele, genotipurile și haplotipurile *HLA-DQB1* și *HLA-DRB1* susceptibile să influențeze comportamentul suicidar pe un eșantion transilvănean de 196 subiecți (din care 98 cu tentative de suicid și suicid finalizat). S-a constatat că genotipurile *HLA-DQB1*02/*06* și *HLA-DRB1*11/*15*, precum și haplotipul *HLA-DRB1*15~DQB1*03*, sunt susceptibile să favorizeze comportamentul suicidar, în timp ce alelele *HLA-DRB1*04*, genotipurile *HLA-DQB1*02/*05* și *HLA-DRB1*01/*03*, precum și haplotipul *DRB1*04~DQB1*03*, au fost identificate ca având un rol protector. Studiul a evidențiat câteva corelații semnificative cu determinanții psihosociali ai comportamentului suicidar. Factori de susceptibilitate s-au dovedit decesul unor apropiați (la posesorii alelei *DQB1*02*) și tulburările de memorie (la cei cu *DQB1*06*), respectiv decepția (la cei cu *DRB1*07* și *DRB1*15*) și

autoagresivitatea (la posesorii alelei *DRB1*15*). Absența problemelor familiale și sociale la posesorii alelei *DRB1*01* și a narcomaniei la posesorii alelei *DQB1*03* au acționat ca factori de protecție. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a realiza o bază de date cuprinzătoare privind frecvența alelelor HLA în populația românească, care să acopere diferitele subgrupuri etnice din toate regiunile țării, permițând stabilirea unor noi asocieri susceptibile de a influența riscul dezvoltării unui comportament suicidar.

STUDIUL 3: Influența unor polimorfisme mononucleotidice asupra comportamentului suicidar

Pornind de la rezultatele promițătoare anunțate de diferite studii, am căutat noi asocieri între fenomenul suicidar sau alte patologii psihiatrice și variantele rs110402 (A;A), (A;G) și (G;G) ale genei *CRHR1*, rs3800373 (A;A), (A;C) și (C;C) ale genei *FKBP5* și rs2289656 (A;A), (A;G) și (G;G) ale genei *NTRK2*. Am constatat că alela A a SNP-ului rs2289656 exercită un efect protector împotriva suicidului, în timp ce genotipul GG al aceluiași SNP acționează ca factor de susceptibilitate. În cazul aceluiași polimorfism s-a evidențiat susceptibilitate pentru dezvoltarea unui comportament suicidar la persoanele acuzând stări de decepție, la pacienții posesori ai alelei A și ai genotipului AG. În schimb, prezența genotipului GG în rândul pacienților acuzând stări de decepție a avut rol protector. Cercetarea a evidențiat diverse asocieri ale polimorfismelor studiate cu determinanți ai comportamentului suicidar, cum ar fi istoricul de abuz și traumatismele în cazul polimorfismului rs110402 al genei *CRHR1*, cu rol protector la posesorii genotipului GG și rol de susceptibilitate la posesorii alelei A. Pentru lotul de 70 de pacienți psihiatrici analizat s-au observat corelații negative între scorul pe scala calității vieții și scorul BDI-II, respectiv între scorul pe scala calității vieții și cel al intensității ideății suicidare. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute în numeroase alte studii.

CONCLUZII

Pe plan mondial suicidul rămâne o importantă problemă de sănătate publică, al cărei mecanism declanșator nu a fost elucidat în ciuda acumulării unui volum impresionant de cunoștințe privind impactul factorilor care îl potențează. Trecând în revistă etiopatogeneza și principalele teorii care au încercat să explice fenomenul suicidar, cercetarea furnizează date comprehensive privind amploarea acestuia în România ultimelor decenii.

În prezenta teză am găsit noi asocieri ale comportamentului suicidar cu markeri genetici pe un lot de pacienți psihiatrici cu tentative de sinucidere, o serie de alele sau genotipuri HLA corelându-se semnificativ cu determinanții psihosociali ai comportamentului suicidar urmăriți în chestionarul administrat. Asocieri semnificative au fost identificate și în cazul SNP-urilor genotipate.

Explorând prezența ideății suicidare și a tristeții prelungite în relație cu factorii psihosociali, calitatea vieții și antecedentele de viață adverse pe un eșantion reprezentativ pentru populația adultă a României, am identificat elemente care favorizează dezvoltarea comportamentului suicidar la nivelul populației generale, conturând profilul persoanelor susceptibile să experimenteze ideăția suicidară. Analiza factorilor de risc în dezvoltarea comportamentului suicidar a evidențiat ca principal factor de risc existența unei patologii psihiatrice, adesea în combinație cu probleme familiale și socio-economice (conflicte la locul de muncă, alcoolism cronic, narcomanie, etc.) și/sau o patologie somatică, implicând și existența unei dureri fizice. Prin diversele metode de colectare a datelor, au fost aduse reale completări la

imaginea complexă a persoanelor cu risc ridicat de sinucidere. Rezultatele obținute susțin importanța comunicării în context conjugal, în contextul pierderii statutului social în momentul pensionării. Psihoterapia individuală și de grup, cu suportul unor asociații de sprijin, pot fi mijloace de intervenție utile, deși accesul dificil la serviciile de psihoterapie (în special în zonele rurale) și costul relativ ridicat al acestora pot constitui obstacole semnificative pentru anumite categorii sociale.

Datele obținute evaluând rata sinuciderilor în timpul pandemiei de COVID-19 sugerează că aceasta a avut un impact asupra sănătății mintale a populației generale, incitând la comportamente suicidare pe fondul izolării sociale ca urmare a măsurilor guvernamentale impuse pentru prevenirea infectării cu virusul SARS-CoV-2. Deși rezultatele nu au relevat o creștere a numărului sinuciderilor, profesioniștii din domeniul sănătății mintale ar trebui să conștientizeze posibilele consecințe pe termen lung și să acționeze pentru a preveni o posibilă criză.

Sinuciderea este un fenomen prevenibil și orice nouă descoperire pe această temă susține implementarea unor programe de prevenție, în acord cu obiectivele dezvoltării durabile și sustenabile trasate de ONU.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Cercetările din această teză oferă o imagine de ansamblu a evoluției fenomenului suicidar în țara noastră, sintetizând în trei tabele datele privind numărul cazurilor înregistrate în ultimele două decenii, frecvența acestora pe întreg teritoriul României, distribuția pe sexe și metodele folosite pentru finalizarea sinuciderii. Depășind dificultățile legate de accesul la datele primare, cercetarea integrează în această sinteză dificilul an 2020, comparând în premieră rata sinuciderilor în timpul primului an al pandemiei de COVID-19 cu situația anilor precedenți.

Analizând factorii psihosociale și antecedentele susceptibile să declanșeze un comportament suicidar, prin aceste cercetări s-au stabilit în premieră corelații statistice semnificative la nivelul unui eșantion reprezentativ pentru populația adultă a României, la nivelul căruia au fost stabilite caracteristicile generale ale persoanelor cu risc ridicat de a dezvolta un comportament suicidar prin aplicarea unui model de regresie logică.

Studiul analizând factorii de risc în dezvoltarea comportamentului suicidar este primul din estul Europei care a investigat factorii declanșatori ai acțiunilor suicidare în mediul clinic, apelând la analiza tematică a interviurilor realizate cu pacienții psihiatrici internați cu tentative de sinucidere. Deși e posibil ca aceste constatări să nu se aplice întregii categorii de pacienți psihiatrici români, studiul oferă un punct de plecare în aprofundarea cunoștințelor despre precursorii tentativelor de sinucidere. Un alt merit al studiului este acela că, utilizând variate metode de culegere a datelor în mediul clinic, oferă o imagine mai complexă privind profilului persoanelor care încearcă să se sinucidă.

Investigând pe două direcții influența markerilor genetici în complexitatea declanșării mecanismelor neurobiologice care favorizează apariția comportamentului suicidar, studiile de față au stabilit o serie de asocieri statistice semnificative, contribuind la completarea bazei naționale de date în domeniul studiat.

Apelând la instrumentele de colectare a datelor propuse de acest studiu, profesioniștii din domeniul sănătății pot identifica mai ușor persoanele cu risc crescut de a dezvolta comportamente suicidare. Astfel, cercetările din această teză își pot aduce contribuția la modelarea unor programe de prevenție a sinuciderii.

PhD THESIS SUMMARY

Genetic markers involved in the development of suicidal behavior

PhD Student **Mihaela-Elvira Vușcan (căs. Cîmpianu)**

PhD Coordinator **Prof. Horea-Vladi Matei, MD, PhD**



CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Suicide - generalities	17
1.1. Definitions, terminology, generalities	17
1.2. Theories of suicide	19
1.3. Epidemiology of suicide	22
1.4. Suicide statistics concerning Romania	26
2. Genetic markers of suicidal behavior	31
3. Legal issues in forensic medicine	41
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Objectives	45
2. General methodology	47
3. 1st Study: The influence of psychosocial and environmental factors in the development of suicidal behavior	51
3.1. Introduction	51
3.2. Determinants of suicidal ideation in the Romanian population	53
3.2.1. Introduction	53
3.2.2. Objectives	56
3.2.3. Materials and methods	56
3.2.4. Results	58
3.2.5. Discussion	61
3.2.6. Conclusions	64
3.3. Risk factors for the development of suicidal behavior	65
3.3.1. Introduction	65
3.3.2. Objectives	67
3.3.3. Materials and methods	67
3.3.4. Results	67
3.3.4.1. Family and social issues	71
3.3.4.2. Economic problems	71
3.3.4.3. Psychiatric pathologies	72
3.3.4.4. Somatic pathologies	73
3.3.5. Discussion	73
3.3.6. Conclusions	77
3.4. The impact of COVID-19 pandemic on the suicidal behavior in Romania	79
3.4.1. Introduction	79
3.4.2. Objectives	81
3.4.3. Materials and methods	81
3.4.4. Results	82
3.4.5. Discussion	83
3.4.6. Conclusions	86

4. 2nd Study: The influence of HLA class II genes on suicidal behavior	87
4.1. Introduction	87
4.2. Objectives	94
4.3. Materials and methods	94
4.4. Results	96
4.5. Discussion	104
4.6. Conclusions	106
5. 3rd Study: The influence of certain mononucleotide polymorphisms on suicidal behavior	107
5.1. Introduction	107
5.2. Objectives	109
5.3. Materials and methods	109
5.4. Results	112
5.5. Discussion	124
5.6. Conclusions	126
6. General conclusions	129
7. Original and innovative contributions of the thesis	133
REFERENCES	135
ANNEXES	153
Annex I. Correlations of <i>DQB1</i> genotypes with psychosocial determinants in the intervention group	153
Annex II. Correlations of <i>DRB1</i> genotypes with psychosocial determinants in the intervention group	155

Keywords:

suicide, suicidal-behavior, suicide ideation, genetic markers, DNA, COVID-19, HLA, SNP, SSP-PCR, RT-PCR

INTRODUCTION

Suicide is an under-recognized public health problem affecting all age groups throughout the world. In spite of the impressive currently available knowledge, the actual impact of the factors that trigger suicidal behavior is not elucidated to an extent allowing the identification of persons presenting an imminent risk, thus enabling the implementation of effective preventive measures in accordance with the goals of sustainable development set by the World Health Organization (WHO) in view of the 2030 Agenda of the United Nations (UN). Suicide prevention is a topical issue and the PhD thesis contributes to the awareness of suicide as a major public health problem.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Reviewing the etiology and the main theories attempting to explain the suicidal phenomenon, this research provides comprehensive data on its extent in Romania over the last decades, targeting its social and economic dimensions from the perspective of education, health and social protection.

Studies have shown that suicide is the result of complex interactions involving several (genetic, psychological, socio-economic, environmental) factors, often associated with mental disorders (mainly depression), in association with alcohol and/or drug consumption. Although several studies have reported a heritability of up to 50%, meta-analyses or genome-wide association studies (GWAS) have failed to identify a common genetic variant associated with the spectrum of suicidal behavior. Research over the last few decades outlined the relevance of biological factors in the complexity of suicidal behavior determinants, using various approaches to identify markers associated with vulnerability to suicide. The most promising results concern the neurotransmitter system, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, neuroinflammatory markers, neurotrophic factors, and lipoproteins. Modern theories combine neurobiological aspects with sociological hypotheses (relationships of one's personality with social or environmental stress), in view of developing an integrated model aimed at finding suicide "biosignatures" that might help identify individuals at risk of developing suicidal behavior.

The present thesis identifies various correlations between suicide or mental disorders associated with suicidal behavior and a series of genetic markers susceptible to leading to such behavior, based on studies carried out on a Transylvanian sample consisting of psychiatric patients and legal medicine suicide cases from Cluj County. It also investigates the impact of psychosocial and environmental factors in triggering suicide ideation and suicidal behavior, including the context of the COVID-19 pandemic.

PERSONAL CONTRIBUTION

OBJECTIVES

The identification and assessment of risk factors for suicide ideation and development of suicidal behavior, in the Romanian cultural context, taking into account the effects of the COVID-19 pandemic, were an important objective of the thesis.

Starting from the premise that the identification of individuals facing suicidal ideas and behaviors is a key element of prevention strategies, the first study sought to highlight the influence of psychosocial and environmental factors in the development of suicidal behavior. A first line of research looked for associations between the existence of obsessive ideas or prolonged states of sadness and indicators of quality of life or adverse life antecedents. The socio-demographic and clinical data were then completed with narrative interviews reflecting the suicide attempters' post-factum perception of their personal experiences related to suicidal behavior, outlining the profile of people at risk of developing such behavior. A third line of research of the first study reviewed the national and international impact of the COVID-19 pandemic on suicidal behavior, also providing statistical comparisons of suicide attempts recorded at the Cluj County Emergency Clinical Hospital (CCECH) before and during the pandemic.

The major objective of this doctoral thesis was to identify new genetic markers responsible for triggering suicide attempts, establishing novel correlations between certain genetic markers and suicidal behavior or mental disorders documented to influence this phenomenon. Genetic studies were conducted on a Transylvanian sample comprising psychiatric patients with a history of suicide attempts under treatment in CCECH and suicide cases recorded at the Institute of Forensic Medicine (IFM) in Cluj-Napoca for the case group, and controls subjected to paternity testing in IFM's Molecular Biology Laboratory. Considering their complex interaction with psychosocial and environmental factors, several candidate genes suggested by various studies to influence the development of suicidal behavior were selected for this purpose.

Containing the most polymorphic group of genes in the entire human genome, the human major histocompatibility complex (MHC) has been intensively scrutinized in this respect due to the involvement of the human leukocyte antigen (HLA) system genes in the pathogenesis of various psychiatric diseases. The objective of the second study of this thesis was to identify *HLA-DQB1* and *HLA-DRB1* alleles, genotypes and haplotypes likely to influence suicidal behavior based on the analyzed sample.

Mononucleotide polymorphisms (SNPs) are the most frequent mutations in the human genome, constituting valuable markers for understanding the molecular bases of various diseases, since their conservation during the evolution of the species allows us to associate alterations in DNA sequences with different phenotypic changes. Multiple studies have associated suicide with the deregulation of various biological processes, serotonergic, noradrenergic, dopaminergic, or glutamatergic dysfunctions of the HPA axis being often invoked in this context. The third doctoral study focused on the identification of polymorphisms specific to the case or the control groups in the study sample following the genotyping of SNPs frequently associated with suicide in similar research: rs110402 (*CRHR1* gene), rs3800373 (*FKBP5* gene) and rs2289656 (*NTRK2* gene).

METHODOLOGY

A sociological questionnaire was designed in view of meeting the research objectives. It allowed the collection of demographic and socio-economic data, while also covering aspects of interest regarding quality of life (Likert scales), psychiatric diagnosis (according to ICD-10), familial histories of suicide and the extent of socio-emotional loneliness (based on De Jong Gierveld/Van Tilburg short scale). Heredo-collateral antecedents were depicted from the medical records.

Pursuing the identification of factors favoring the development of suicidal ideation in the context of depressive states and socio-emotional loneliness induced by social isolation, the questionnaire was administered to a number of 1102 people aged over 18 years, using the method of computer-assisted telephone interviews (CATI). The interview script included information related to confidentiality, anonymity and data protection policies, requiring verbally expressed informed consent. Descriptive statistics, inferential and multivariate analysis were used in analyzing the data produced by this transversal quantitative research. The Pearson correlation test and binary logistic regression were applied using the SPSS software.

The second research line of the first study used a mixed design, based on both a quantitative investigation - the administering of the aforementioned research questionnaire and of a battery of tests (Beck Depression Inventory II, Columbia Scale for the Assessment of the Severity of Suicidal Risk), and on a qualitative investigation carried out in a clinical setting. Seventy psychiatric patients voluntarily participated in a narrative interview, sharing their experiences related to the suicidal episode. The interview transcripts were supplemented with information from the patients' medical records. The quantitative data were analyzed with the SPSS program, while a thematic analysis was employed to decipher the motives leading to the suicide attempts.

The third line of the research used an observational-descriptive design, retrospectively analyzing suicide attempts of individuals with/without a psychiatric diagnosis based on the International Classification of Diseases, 10th edition (ICD-10), registered before and during the COVID-19 pandemic at CCECH, as well as IFM reports of completed suicides. The SPSS software was employed for data analysis.

The genetic studies focused on associating aspects of suicidal behavior and suicidal ideation with the tested markers: HLA class II alleles (2nd study), and rs110402 (*CRHR1* gene), rs2289656 (*NTRK2* gene) and rs3800373 (*FKBP5* gene) SNPs (3rd study). These involved a study group composed of 196 individuals. The experimental group consisted of 70 patients from the Psychiatry Clinic at SCJU Cluj and 28 cases of completed suicides recorded at the IFM Cluj-Napoca. The control group comprised 98 individuals with no suicidal history who underwent paternity DNA testing at the Molecular Biology Laboratory of IFM Cluj-Napoca. No kinship relationships between the case-control groups or within each group were observed.

Provided an expressed consent for genetic testing was secured, the subjects (or the deceased's relatives) were administered the research questionnaire and venous blood samples from the study group were collected in EDTA vials, then genomic DNA was extracted and purified with commercial kits. All molecular analyses were performed in the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy (IHUMP) laboratories of the Cell and Molecular Biology Discipline.

Two sequence-specific primer PCR (SSP-PCR) methods were used in HLA typing. The first made use of HLA-ReadyGene DQ and HLA-Ready Gene DR kits, ethidium bromide-stained amplicons being separated by agarose gel electrophoresis and subsequently visualized on an UV

transilluminator. The second method employed HLA-FluoGene DRDQ kits enabling automated detection of final post-PCR fluorescence on the FluoVista analyzer. Data tables were generated using Microsoft Excel, while the Epi Info™ software was used for statistical analysis. A statistical significance threshold of 0.05 was applied.

TaqMan® Genotyping kits were used in the third study, specific primers for each analyzed SNP being employed during the RT-PCR. Primary data were delivered by the HID Real-Time PCR Analysis Software.

Approvals from the Ethics Committees of IHUMP, IFM and CCECH were secured for all study protocols and procedures involving human subjects. All research complied with ethical and confidentiality regulations.

RESULTS

1st STUDY: The influence of psychosocial and environmental factors in the development of suicidal behavior

Exploring the presence of suicidal ideation and prolonged sadness in relation to psychosocial factors, quality of life and adverse life antecedents on a representative sample for the Romanian population, the study determined that a low level of psychosocial and quality of life dimensions, as well as antecedents of adverse life events, increase the risk of suicidal ideation and prolonged sadness in the general population. As a result, the profile of people at risk of developing suicidal ideation was depicted as follows: young or middle-aged adult with a low level of education and a reduced state of overall happiness, experiencing episodes of depression, self-harm and trauma. It was found that suicidal ideation is independent of gender and area of residence. The study confirmed that suicide and suicidal ideation are complex issues, the most common reasons provided for a suicide attempt being family conflicts, associated or not with alcohol consumption, often triggered by a momentary impulse. The research highlighted socio-demographic and clinical features that characterize psychiatric patients with a history of suicidal behavior, exposing the main risk factors that precipitate the manifestation of such behavior, based on information collected immediately after the suicide attempt episodes. Evaluating the suicide rates in Romania during the COVID-19 pandemic compared to previous years, the research suggests that the pandemic bore an impact on the mental health of the general population, inciting suicidal behavior against the backdrop of social isolation as a result of government measures imposed to prevent the spreading of the SARS-CoV-2 virus infection.

2nd STUDY: The influence of HLA class II genes on suicidal behavior

The major objective of the thesis aimed to establish novel correlations between suicide/suicidal behavior/psychiatric conditions and a series of genetic markers responsible for their emergence. In the 2nd study we identified *HLA-DQB1* and *HLA-DRB1* alleles, genotypes and haplotypes likely to influence suicidal behavior on the analyzed Transylvanian sample (196 subjects of which 98 with suicide attempts and completed suicides). The *HLA-DQB1*02/*06* and *HLA-DRB1*11/*15* genotypes, as well as the *HLA-DRB1*15~DQB1*03* haplotype, were found to be likely to favor suicidal behavior, while the *HLA-DRB1*04* allele, the *HLA-DQB1*02/*05* and *HLA-DRB1*01/*03* genotypes, as well as the *DRB1*04~DQB1*03* haplotype, were identified as exerting a protective role. The study highlighted significant correlations with several psychosocial determinants of suicidal behavior. Susceptibility factors proved to be the death of close relatives (for those possessing the *DQB1*02* allele), memory disorders (in *DQB1*06*

subjects), disappointment (for those possessing the *DRB1*07* or *DRB1*15* alleles) and self-aggression (in those with the *DRB1*15* allele). The absence of family and social problems in the holders of the *DRB1*01* allele and of drug addiction in those possessing the *DQB1*03* allele acted as protective factors. Additional research is needed to create a comprehensive database on the frequency of HLA alleles in the Romanian population. Coverage of the various ethnic subgroups from all regions of the country may allow the identification of new associations likely to influence the risk of developing suicidal behavior.

3rd STUDY: The influence of certain mononucleotide polymorphisms on suicidal behavior

Based on promising results reported by different studies, we searched for new associations between the suicidal phenomenon or other psychiatric pathologies and the rs110402 (A;A), (A;G) and (G;G) variants of the *CRHR1* gene, the rs3800373 (A;A), (A;C) and (C;C) variants of the *FKBP5* gene and the rs2289656 (A;A), (A;G) and (G;G) variants of the *NTRK2* gene. We found that the A allele of the rs2289656 SNP exerts a protective effect against suicide, while the GG genotype of the same SNP acts as a susceptibility factor. In the case of the same polymorphism, the rs2289656 A allele and AG genotype in subjects accusing deception also suggested a susceptibility role for the development of suicidal behavior. Instead, the presence of the GG genotype in subjects accusing deception exerted a protective role. The research highlighted various associations of the studied polymorphisms with determinants of suicidal behavior, such as a history of abuse or trauma for the rs110402 polymorphism of the *CRHR1* gene, with a protective role in the presence of the GG genotype and a susceptibility role for the A allele. For the analyzed group of 70 psychiatric patients, negative correlations between the quality of life and the BDI-II scores were observed, as well as between the score on the quality of life scale and the intensity of suicidal ideation. These results are consistent with those reported in other studies.

CONCLUSIONS

On a global level, suicide remains an important public health problem, its triggering mechanisms not being fully elucidated in spite of the impressive existing knowledge regarding the impact of its potentiating factors. Reviewing the etiopathogenesis and the main theories that tried to explain the suicidal phenomenon, the research provides comprehensive data on its extent in Romania over the recent decades.

In this thesis we found new associations between suicidal behavior and genetic markers in a group of psychiatric patients with a history of suicide attempts, various HLA alleles or genotypes correlating significantly with the psychosocial determinants of suicidal behavior tracked in the administered questionnaire. Significant associations were also identified in the case of genotyped SNPs.

Exploring the presence of suicidal ideation and prolonged sadness in relation to psychosocial factors, quality of life and adverse life antecedents on a sample representative of the adult population of Romania, we identified elements that favor the development of suicidal behavior in the general population, outlining the profile of subjects at risk to develop suicide ideation.

The analysis of risk factors in the development of suicidal behavior singled out the presence of a psychiatric pathology as the main risk factor, often on the background of family or

socio-economic problems (work conflicts, chronic alcoholism, etc.) and/or a somatic pathology involving physical pain.

The employment of various data collection methods added new details to the complex profiling model of people at high risk of suicide. The study results support the importance of marital communication, particularly in the context of losing ones' social status at the moment of retirement. Individual and group psychotherapy, or assistance of various support associations, can prove to be useful intervention means, although a difficult access to psychotherapy services (in rural areas in particular) and the relatively high cost of such services may diminish their effectiveness.

Data assessing the suicide rates during the COVID-19 pandemic suggest that the latter has had a negative impact on the mental health of the general population, inciting suicidal behavior amid the social isolation imposed by government measures aiming to contain the SARS-CoV-2 infection. Although our results did not reveal an increase in suicide rates, mental health professionals should be aware of the possible long-term consequences and take actions to prevent a possible crisis.

Suicide is a preventable phenomenon and any new findings on this topic support the implementation of certain prevention programs, in accordance with the goals of sustainable development outlined by the UN.

ORIGINAL AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

This research overviews the evolution of the suicidal phenomenon in Romania, summarizing the number of cases registered in the last two decades, their frequency throughout the country, their distribution by gender and the methods used to complete the suicide attempts. Overcoming difficulties related to accessing of primary data, the research integrates the difficult year 2020 into this synthesis, comparing for the first time the rate of suicides during the first year of the COVID-19 pandemic with those of previous years.

The research produced first-time statistically significant correlations on a representative sample for the adult population of Romania when analyzing the psychosocial factors and antecedents likely to trigger suicidal behavior. Moreover, it outlines the general characteristics of people at high risk of developing suicidal behavior by applying a logistic regression model.

The study analyzing risk factors susceptible to triggering suicidal behavior is the first one in the Eastern European region to conduct such an investigation in a clinical environment, making use of thematic analyses when interviewing psychiatric patients hospitalized following suicide attempts. Although these findings may not be applicable to the entire category of Romanian psychiatric patients, the study provides a starting point for deepening the knowledge about the precursors of suicide attempts. Another merit of the study is that, using various methods of data collection in the clinical setting, it provides a more complex picture regarding the profile of people attempting suicide.

Investigating the influence of two classes of genetic markers in regard to the complex neurobiological mechanisms susceptible to triggering suicidal behavior, the present studies established a series of statistically significant associations, contributing to the completion of a national database in the studied field.

By using the data collection tools proposed by this study, health professionals can more easily identify people at high risk of developing suicidal behavior. Thus, this research can contribute to the modeling of suicide prevention programs.