

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY FROM
TIMISOARA**

FACULTY OF MEDICINE

Department III – FUNCTIONAL SCIENCES

ZIMBRU RĂZVAN-IONUȚ



PHD THESIS

**THE IMPACT OF CO-EXPOSURE TO MULTIPLE
ALLERGENS UPON THE ALLERGIC IMMUNE RESPONSE**

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. DR. CARMEN PANAITESCU

Timișoara

2025

ABSTRACT

I. INTRODUCTION

This PhD thesis explores the complex interplay between environmental allergens, dietary factors and molecular regulatory mechanisms involved in the pathogenesis of allergic asthma. It focuses specifically on the cumulative effects of co-sensitization and co-exposure to multiple allergens upon the modulation of the allergic immune response. This research has focused on two allergens with the highest rate of sensitization in the indoor environment, the house dust mites (*Dermatophagoides pteronissinus*, HDM), and in the outdoor environment, ragweed pollen (*Ambrosia artemisiifolia*, short ragweed, RW). In a realistic context, the presence of a high fructose diet (HFrD) may favor the occurrence of metabolic imbalances with an impact on both systemic inflammation and molecular and clinical expression of asthma. Our results emphasize that simultaneous exposure to HDM and RW amplifies airway hyperresponsiveness and aggravates metabolic dysfunctions, such as dyslipidemia and abdominal obesity, through a systemic inflammatory mechanism. The significant correlation between serum total IgE and C-reactive protein (CRP) values in the context of HFrD-associated asthma supports the existence of an interdependence between systemic inflammation and allergic response.

Through the combined use of *in vivo* and *in vitro* experimental models, the research demonstrates that concomitant exposure to multiple allergens leads to a marked impairment of the integrity of the bronchial epithelial barrier and triggers a more intense inflammatory response than exposure to single allergens. Therefore, the central role of the respiratory epithelium in the initiation and perpetuation of allergic inflammation is emphasized. In this regard, the study provides evidence for the detrimental effects of the allergens that have a protease structure such as Amb a 1, Amb a 11 and Der p 1 on tight junctions, demonstrating significant disruption of intercellular proteins following co-exposure, such as zonula occludens-1 (ZO-1).

The thesis also investigates the role of microRNAs (miRNAs) as essential modulators of inflammatory pathways involved in asthma and highlights their potential as therapeutic targets. By determining the expression profiling of relevant miRNAs, novel molecular mechanisms are proposed that may help to individualize therapeutic strategies.

Overall, this thesis offers significant contributions into the understanding of the complex interplay between respiratory allergen co-sensitization, dietary factors and epithelial barrier dysfunction, providing a solid foundation for the development of personalized therapeutic strategies in allergic asthma.

II. GENERAL PART

The respiratory system performs a variety of functions, closely related to the specific segment of the respiratory structure involved. The lower airway wall is composed of respiratory epithelium, connective tissue, smooth muscle, cartilage and a well-developed vascular network. The epithelial type varies throughout the respiratory tract, from pseudostratified ciliated columnar epithelium in the trachea to simple columnar or cuboidal columnar epithelium in the terminal bronchioles, with a progressive decrease in caliceal and ciliated cells and an increase in Clara cells. In bronchioles, cartilage and submucous glands disappear, but smooth muscle persists throughout the respiratory tree.

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by recurrent episodes of wheezing, dyspnea, cough and chest tightness, associated with periodic variability in bronchial hyperresponsiveness and local inflammation, manifested inconsistently. Affecting over 300 million people worldwide, its prevalence is expected to continue to increase in the coming years. Asthma is a heterogeneous disease, characterized by multiple phenotypes and endotypes, reflecting the diversity of immunological and pathophysiological mechanisms involved in its development. The most intensively studied endotypes of asthma are type 2 (T2-high), characterized by increased expression of the cytokines IL-4, IL-5 and IL-13, associated with eosinophilic and allergic inflammation, and the non-T2 (T2-low) endotype, defined by predominant involvement of Th1 and Th17 immune responses, neutrophilic inflammation and frequently associated with obesity and a reduced therapeutic response to corticosteroids.

The etiology of asthma results from the complex interaction between genetic predisposition and environmental factors. Exposure to respiratory allergens triggers a response from bronchial epithelial cells, which release alarmins such as TSLP, IL-25 and IL-33, initiating immunological cascades that activate various inflammatory effectors. In this complex regulatory network, microRNAs, non-coding RNA molecules that modulate gene expression post-transcriptionally, play a key role. They are involved in fundamental mechanisms such as inflammation, airway remodeling and regulation of immune responses,

and are considered promising biomarkers and potential therapeutic targets for personalized interventions in asthma.

Airway hyperresponsiveness is a defining feature of asthma, manifested by an exaggerated bronchoconstrictor response to variable stimuli. This feature correlates with the severity of the disease, the frequency of exacerbations and the degree of bronchial inflammation. Bronchial hyperresponsiveness is modulated by several factors, including exposure to perennial or seasonal allergens, viral respiratory tract infections, corticosteroid administration or biologic therapies. Its clinical evaluation is performed by bronchoprovocation tests using direct (methacholine) or indirect (mannitol) agents. Methacholine provides increased sensitivity in detecting nonspecific hyperreactivity, whereas mannitol correlates more specifically with eosinophilic-type inflammation.

Pathophysiologic mechanisms involved include both acute inflammation and chronic airway structural changes. Bronchial remodeling, driven by smooth muscle hypertrophy and hyperplasia, excessive extracellular matrix deposition and bronchial wall thickening, contributes to increased contractility and reduced airway relaxation capacity. In addition, mast cells and their secreted mediators, such as histamine, prostaglandin D₂, IL-4, IL-13 and TNF- α , play a central role in maintaining increased bronchial tone and exacerbating obstruction. These mechanisms are compounded by genetic susceptibility, reflected by polymorphic variations in genes involved in the regulation of inflammatory and metabolic responses, which may influence the severity and course of asthma.

Animal models have shown that exposure to allergens such as house dust mites and ragweed pollen induces both immediate and delayed responses associated with eosinophilic inflammation and bronchial dysfunction. Obesity, particularly that induced by high fructose diets, amplifies asthma severity through mechanisms involving chronic systemic inflammation and metabolic imbalances, in which proinflammatory adipokines such as IL-6 play a key role. Co-sensitization to multiple allergens in the setting of obesity significantly aggravates asthmatic pathology, as evidenced by *ex vivo* functional tests, histological analysis and inflammatory biomarker profiling.

The airway epithelium is an essential physical and immunological barrier against environmental factors (allergens, pathogens, pollutants, etc.), consisting of a mosaic of specialized cells (ciliated, goblet, Clara, basal cells) and tight junction structures that ensure the cohesion and integrity of the tissue barrier. In asthma, this barrier is often compromised,

with reduced expression of junctional proteins (ZO-1, occludin), increased intercellular permeability and activation of epithelial stress markers such as EGFR and HSP70.

Allergens with protease activity, such as Der p 1 (HDM) and Amb a 1/Amb a 11 (ragweed pollen), contribute to the degradation of epithelial junctions and induce a Th2-type immune response. Co-exposure to these allergens induces synergistic effects, enhancing inflammation and epithelial dysfunction to a greater extent than each allergen molecule alone.

In vitro experimental models with human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface (ALI) demonstrated that allergen-exposed epithelia are more vulnerable to noxious stimuli, as reflected by decreased transepithelial electrical resistance (TEER) and altered junctional protein distribution, visualized by immunofluorescence studies.

MiRNAs are small non-coding molecules (18-25 nucleotides) that regulate gene expression post-transcriptionally, by blocking translation of messenger RNA or by promoting its degradation. They control fundamental processes such as cell proliferation, apoptosis, inflammation and immune responses. The miRNA expression profile is specific depending on the pathology phenotype: miR-223 and miR-146a are associated with neutrophilic (T2-low) asthma, while others, such as miR-21, miR-145 and miR-155, influence inflammation, smooth muscle hypertrophy and airway remodeling in T2-high asthma.

The biogenesis of miRNA involves several sequential steps: transcription by RNA polymerase II, nuclear processing by the DROSHA-DGCR8 complex, export to the cytoplasm via Exportin-5 and final cleavage by Dicer. The mature miRNA is loaded into the RISC complex, which recognizes complementary mRNA sequences and modulates gene expression. Due to their specificity and influence on molecular networks, miRNAs are considered promising biomarkers for molecular diagnosis and personalized therapy of asthma.

III. SPECIAL PART

This PhD thesis analyzes the complex interplay between environmental allergens, dietary factors and molecular mechanisms that modulate the pathogenesis and exacerbations of allergic asthma. The main focus is on the synergistic impact of co-sensitization to house dust mites and ragweed pollen in the context of a high fructose diet with obesogenic potential. The study utilizes *in vivo* and *in vitro* experimental models to explore how HFrD contributes to

the intensification of asthma severity by promoting abdominal obesity, amplifying local and systemic inflammation and increasing airway hyperresponsiveness.

A central element of the research is the analysis of the effects of co-sensitization to RW and HDM in parallel with the impact of high fructose diet-induced obesity. The results demonstrate that combined exposure to the two allergens significantly worsens the severity of asthma, manifested by marked airway hyperresponsiveness, increased levels of inflammatory markers and an obvious systemic inflammatory status. Rats in the co-sensitized group showed significantly higher tracheal reactivity to methacholine compared to groups exposed to a single allergen alone, suggesting an additive or even synergistic effect in amplifying the allergic response.

Moreover, the study highlights how the high-fructose diet exacerbates allergic inflammation. Rats exposed to a HFrD displayed significant weight gain, an increase in abdominal circumference and elevated levels of systemic markers of inflammation, such as triglycerides, glucose and CRP. These rats also exhibited elevated serum IgE levels, a known marker of allergic sensitization. The co-sensitization to RW and HDM allergens further exacerbated these metabolic disturbances, leading to worsened dyslipidemia and increased serum lipid levels. Notably, these findings highlight the interconnected nature of obesity and allergy, revealing how diet-induced obesity may modulate immune responses and worsen asthma symptoms. The combination of an obesogenic diet and environmental allergens leads to a compounding effect, resulting in a more severe asthma phenotype characterized by increased inflammation, impaired lung function and structural changes in the airways.

Histological analyses of lung tissue from these rats revealed significant inflammation and airway remodeling, including smooth muscle hypertrophy and thickening of the bronchial walls. These structural changes were most pronounced in the OHR group, which had both combined allergen exposure and the high-fructose diet. These observations suggest that the combination of both environmental allergens and an obesogenic diet not only worsens the inflammatory response but also promotes airway remodeling, which is a hallmark of chronic asthma. Furthermore, this research illustrates how diet-induced obesity can have a profound impact on the progression and severity of allergic asthma.

On a cellular level, the study also employs an air-liquid interface model using normal human bronchial epithelial (NHBE) cells to assess the effects of single versus combined allergen exposure on epithelial barrier integrity. The ALI model mimics the conditions of the

human airway, providing a relevant platform for understanding how allergens interact with the respiratory epithelium. TEER measurements and immunofluorescence analysis of tight junction proteins, such as zonula occludens-1, were used to evaluate changes in epithelial barrier function. The results showed that exposure to combined RW and HDM allergens led to a significant decrease in TEER, with the greatest reduction observed in the groups exposed to higher concentrations of both allergens. Exposure to RW 200 led to a reduction in TEER, reaching $52.14\% \pm 4.88\%$ of baseline levels ($p = 0.0001$). In contrast, HDM 200 induced a more pronounced decrease, with TEER values falling to $47.87\% \pm 3.91\%$ ($p = 0.0001$), indicating a stronger disruptive effect on epithelial barrier integrity. Notably, simultaneous exposure to both RW and HDM at 200 $\mu\text{g/mL}$ further exacerbated the impairment, resulting in a TEER reduction to $44.18\% \pm 6.19\%$ of baseline. This finding suggests that the combined exposure to these two allergens is more damaging to the epithelial barrier than individual allergen exposures.

Furthermore, immunofluorescence staining revealed that the integrity of tight junctions, represented by ZO-1, was significantly compromised in the combined exposure groups. In the control group, ZO-1 staining appeared continuous and well-defined along cell borders, reflecting preserved epithelial barrier integrity. In contrast, exposure to increasing concentrations of HR (50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) induced a dose-dependent disruption of ZO-1 expression, characterized by fragmented junctional staining and reduced immunofluorescence intensity. The most pronounced morphological alterations were observed in the HR 200 condition (RW + HDM at 200 $\mu\text{g/mL}$), which showed extensive tight junction disorganization, in line with the marked TEER reduction indicating enhanced epithelial permeability. The greatest decreases in immunofluorescence intensity, relative to control, were recorded in the HR 200 ($11.47\% \pm 6.4\%$) and HDM 200 ($13.81\% \pm 6.33\%$) groups, followed by RW 200 ($19.18\% \pm 8.28\%$) and HR 100 ($21.05\% \pm 7.14\%$). While normalized TEER values at 72 hours quantitatively reflect barrier integrity, ZO-1 staining provides a complementary visual representation of tight junction architecture. These results highlight the synergistic effects of multiple allergens in disrupting epithelial barrier function, which is a key feature in the pathogenesis of allergic asthma. The damage to the epithelial barrier likely facilitates the entry of allergens into the airway, further exacerbating inflammation and immune responses.

In addition to these cell culture investigations, functional and histological analyses on rats, the study also explores the role of miRNAs as key regulators of inflammation and potential therapeutic targets. The profiling of miRNAs implicated in asthma-related pathways

offers valuable insights into the molecular mechanisms underlying the inflammatory response in allergic asthma. Several miRNAs emerged as key diagnostic markers associated with distinct pathophysiological mechanisms in asthma. Notably, miR-155 was consistently upregulated, reinforcing its role in promoting Th2-driven inflammation and airway remodeling, with expression levels correlating with disease severity. Similarly, miR-21 was found to intensify allergic airway inflammation by suppressing anti-inflammatory pathways and enhancing IL-13 signaling. Reduced expression of miR-146a, a critical modulator of the NF- κ B and IRAK1/TRAF6 axes, was linked to persistent inflammation. miR-145-5p, overexpressed in airway smooth muscle cells, was associated with increased bronchial hyperresponsiveness and mucus hypersecretion. Elevated levels of miR-223 were observed in acute asthma, reflecting a shift toward neutrophilic inflammation and Th17/Th2 imbalance. In contrast, members of the let-7 family were downregulated in asthmatic profiles, suggesting a loss of their protective functions in maintaining epithelial barrier integrity and mitigating oxidative stress. Together, these molecular signatures highlight the potential of specific miRNAs to serve not only as diagnostic biomarkers but also as indicators of asthma endotype and disease progression. By identifying novel miRNAs that modulate immune and inflammatory pathways, the research aims to inform future precision medicine approaches for treating allergic asthma. These findings have significant implications for developing targeted therapies that can more effectively address the complex interplay between allergens, diet and immune dysfunction in asthma.

This research significantly advances our understanding of the complex interactions between environmental allergens, diet-induced obesity and molecular regulators in the pathogenesis of allergic asthma. By demonstrating how the combination of environmental allergens like RW and HDM, coupled with an obesogenic diet, exacerbates asthma symptoms and promotes airway remodeling, the thesis highlights the need for a comprehensive approach in asthma research. It emphasizes the importance of considering both allergen co-exposure and metabolic factors, such as diet, in understanding asthma's multifactorial nature. Furthermore, the study highlights the potential of miRNA-based therapies in treating asthma, opening new avenues for personalized medicine and more effective treatment strategies. Ultimately, this thesis contributes to the development of a more nuanced understanding of asthma and paves the way for future research into targeted therapeutic interventions that address both environmental and metabolic contributors to disease.

IV. FINAL CONCLUSIONS

The research conducted in this PhD thesis provides a comprehensive understanding of asthma pathophysiology, highlighting the complex interplay between allergen-induced inflammation, epithelial barrier disruption, metabolic alterations and immune dysregulation. The study demonstrates that co-sensitization to house dust mites and ragweed pollen significantly amplifies asthma severity, leading to a more pronounced airway hyperresponsiveness compared to single-allergen exposure. Additionally, a high-fructose diet worsens asthma symptoms by inducing obesity, particularly abdominal obesity and increasing both local and systemic inflammation, which exacerbates the clinical presentation of asthma.

The research also shows that combined allergen exposure results in a more severe disruption of bronchial epithelial barrier integrity, activating inflammatory and proteolytic pathways that compromise the barrier function and escalate airway inflammation. This highlights the synergistic nature of allergen co-exposure and its contribution to the complexity of real-world asthma scenarios. Furthermore, the study emphasizes the active role of the bronchial epithelium in asthma, as observed through techniques such as TEER monitoring and immunofluorescence imaging.

A key aspect of the findings is the role of miRNAs, which are critical regulators in asthma pathogenesis. Specific miRNAs, such as miR-155, miR-21, and miR-145, influence immune polarization, airway inflammation and remodeling by modulating cytokine production and oxidative stress pathways. The research also identifies how dysregulated miRNA expression can serve as biomarkers for asthma severity and progression. Elevated levels of miR-126 and miR-223 correlate with Th2/Th17-mediated inflammation, while reduced levels of let-7a and miR-133a indicate impaired lung function and airway hyperresponsiveness.

The study also emphasizes the impact of environmental triggers, such as allergens and pollutants, on miRNA networks, which contribute to asthma exacerbations. Importantly, miRNA profiling offers potential for precision medicine, enabling personalized therapies based on distinct asthma endotypes. This research suggests that targeting miRNAs could be a novel therapeutic approach, with miRNA-based treatments showing promise in reducing inflammation and airway remodeling. With further research and validation, miRNA-based therapies could play a crucial role in advancing personalized treatment strategies for asthma.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul III ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

ZIMBRU RĂZVAN-IONUȚ



TEZĂ DE DOCTORAT

**IMPACTUL CO-EXPUNERII LA MULTIPLE ALERGENE ASUPRA
RASPUNSULUI IMUN ALERGIC**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CARMEN PANAITESCU

Timișoara

2025

REZUMAT

I. INTRODUCERE

Această teză de doctorat explorează interacțiunea complexă dintre alergenii din mediu, factorii dietetici și mecanisme moleculare de reglare implicate în patogeneza astmului alergic. Lucrarea se concentrează în mod special asupra efectelor cumulative ale co-sensibilizării și co-expunerii la multiple alergene asupra modulării răspunsului imun alergic. Aceste cercetări s-au focalizat pe două alergene cu cea mai crescută rată a sensibilizării în mediul interior, respectiv acarienii din praful de casă (*Dermatophagoides pteronissinus*, house dust mites, HDM), precum și în mediul exterior, polenul de ambrozia (*Ambrosia artemisiifolia*, short ragweed, RW). Într-un context realist, prezența unui regim alimentar bogat în fructoză (HFrD) poate favoriza apariția unor dezechilibre metabolice cu impact atât asupra inflamației sistemice, cât și asupra expresiei moleculare și clinice ale astmului. Rezultatele obținute evidențiază faptul că expunerea simultană la HDM și RW amplifică hiperreactivitatea căilor respiratorii și agravează disfuncțiile metabolice, precum dislipidemia și obezitatea abdominală, printr-un mecanism inflamator sistemic. Corelația semnificativă dintre valorile serice ale IgE total și ale proteinei C reactive (CRP) în contextul astmului asociat cu HFrD susține existența unei interdependențe între inflamația sistemică și răspunsul alergic.

Prin utilizarea combinată a modelelor experimentale *in vivo* și *in vitro*, cercetarea demonstrează că expunerea concomitentă la mai multe alergene determină o afectare marcată a integrității barierei epiteliale bronșice și declanșează un răspuns inflamator mai intens decât în cazul expunerii la alergene individuale. Astfel, este evidențiat rolul central al epiteliului respirator în inițierea și perpetuarea inflamației alergice. În acest sens, studiul aduce dovezi privind efectele nocive ale alergenilor cu structură de protează precum Amb a 1, Amb a 11 și Der p 1 asupra joncțiunilor strânse, demonstrând perturbarea semnificativă a proteinelor intercelulare în urma co-expunerii, precum ar fi zonula occludens-1 (ZO-1).

De asemenea, lucrarea investighează rolul microARN-urilor (miRNA) ca modulatori esențiali ai căilor inflamatorii implicate în astm și evidențiază potențialul acestora ca ținte terapeutice. Prin determinarea profilului expresiei unor miRNA-uri relevante, sunt propuse noi mecanisme moleculare care pot contribui la individualizarea strategiilor terapeutice.

În ansamblu, această teză aduce contribuții importante la înțelegerea interacțiunilor dintre co-sensibilizarea alergenelor respiratorii, dieta și disfuncția epitelială, oferind o bază solidă pentru dezvoltarea unor intervenții terapeutice personalizate în astmul alergic.

II. PARTEA GENERALĂ

Sistemul respirator îndeplinește variate funcții, în strânsă legătură cu segmentul specific al structurii respiratorii implicat. Peretele căilor respiratorii inferioare este compus din epiteliu respirator, țesut conjunctiv, mușchi neted, cartilaj și o rețea vasculară bine dezvoltată. Tipul epitelial variază de-a lungul tractului respirator, de la epiteliul columnar pseudostratificat ciliar în trahee, până la epiteliul columnar simplu sau cuboidal în bronhiiolele terminale, cu o scădere progresivă a celulelor caliciforme și ciliate și o creștere a celulelor Clara. În bronhiiole, cartilajul și glandele submucoase dispar, însă mușchiul neted persistă pe tot parcursul arborelui respirator.

Astmul este o afecțiune inflamatorie cronică a căilor respiratorii, caracterizată prin episoade recurente de wheezing, dispnee, tuse și constricție toracică, asociate cu o variabilitate periodică a hiperreactivității bronșice și a inflamației locale, manifestată inconstant. Afectând peste 300 de milioane de persoane la nivel mondial, se estimează că prevalența sa va continua să crească în următorii ani. Astmul este o patologie eterogenă, caracterizată prin multiple fenotipuri și endotipuri, care reflectă diversitatea mecanismelor imunologice și fiziopatologice implicate în dezvoltarea acesteia. Cele mai intens studiate endotipuri ale astmului sunt cel de tip 2 (T2-high), caracterizat prin expresia crescută a citokinelor IL-4, IL-5 și IL-13, asociate cu inflamație eozinofilică și alergică, și endotipul non-T2 (T2-low), definit prin implicarea predominantă a răspunsurilor imune de tip Th1 și Th17, inflamație neutrofilică și, frecvent, asociat cu obezitatea și un răspuns terapeutic redus la corticosteroizi.

Etiologia astmului rezultă din interacțiunea complexă dintre predispoziția genetică și factorii de mediu. Expunerea la alergene respiratorii declanșează un răspuns din partea celulelor epiteliale bronșice, care eliberează alarmine precum TSLP, IL-25 și IL-33, inițiind cascade imunologice ce activează diverși efectori inflamatori. În această rețea complexă de reglare, microARN-urile, molecule de ARN necodificatoare care modulează expresia genică post-transcripțional, joacă un rol esențial. Acestea sunt implicate în mecanisme fundamentale precum inflamația, remodelarea căilor respiratorii și reglarea răspunsurilor imune, fiind

totodată considerate biomarkeri promițători și potențiale ținte terapeutice pentru intervenții personalizate în astm.

Hiperreactivitatea căilor respiratorii reprezintă o caracteristică definitorie a astmului, manifestată printr-un răspuns bronhoconstrictor exagerat la stimuli variabili. Această trăsătură se corelează cu severitatea bolii, frecvența exacerbarilor și gradul inflamației bronșice. Hiperreactivitatea bronșică este modulată de o serie de factori, inclusiv expunerea la alergene perene sau sezoniere, infecțiile virale ale tractului respirator, administrarea de corticosteroizi sau terapii biologice. Evaluarea sa clinică se realizează prin teste de bronhoprovocare, utilizând agenți direcți (metacolina) sau indirecti (manitolul). Metacolina oferă o sensibilitate crescută în detectarea hiperreactivității nespecifice, în timp ce manitolul se corelează mai specific cu inflamația de tip eozinofilic.

Mecanismele fiziopatologice implicate includ atât inflamația acută, cât și modificările structurale cronice ale căilor respiratorii. Remodelarea bronșică, determinată de hipertrofia și hiperplazia mușchiului neted, depunerea excesivă de matrice extracelulară și îngroșarea peretelui bronșic, contribuie la creșterea contractilității și la reducerea capacității de relaxare a căilor aeriene. În plus, mastocitele și mediatorii secretați de acestea, precum histamina, prostaglandina D₂, IL-4, IL-13 și TNF- α , joacă un rol central în menținerea tonusului bronșic crescut și în accentuarea obstrucției. Acestor mecanisme li se adaugă susceptibilitatea genetică, reflectată prin variații polimorfe în gene implicate în reglarea răspunsurilor inflamatorii și metabolice, care pot influența severitatea și evoluția astmului.

Modelele animale au evidențiat că expunerea la alergene precum acarienii din praful de casă și polenul de ambrozia induce atât răspunsuri imediate, cât și tardive, asociate cu inflamație eozinofilică și disfuncție bronșică. Obezitatea, în special cea indusă de diete bogate în fructoză, amplifică severitatea astmului prin mecanisme care implică inflamația cronică sistemică și dezechilibrele metabolice, în care adipokinele proinflamatorii, precum IL-6, joacă un rol esențial. Co-sensibilizarea la mai multe alergene, pe fondul obezității, agravează semnificativ patologia astmatică, aspect evidențiat prin teste funcționale ex vivo, analize histologice și prin determinarea profilului biomarkerilor inflamatori.

Epiteliul căilor respiratorii reprezintă o barieră esențială, fizică și imunologică, împotriva factorilor de mediu (alergene, patogeni, poluanți etc.), fiind alcătuit dintr-un mozaic de celule specializate (ciliate, caliciforme, Clara, celule bazale) și din structuri de joncțiuni strânse care asigură coeziunea și integritatea barierei tisulare. În astm, această barieră este adesea

compromisă, cu reducerea expresiei proteinelor de joncțiune (ZO-1, ocludina), creșterea permeabilității intercelulare și activarea markerilor de stres epitelial, precum EGFR și HSP70.

Alergenele cu activitate proteazică, precum Der p 1 (HDM) și Amb a 1/Amb a 11 (polen de ambrozia), contribuie la degradarea joncțiunilor epiteliale și induc un răspuns imun de tip Th2. Co-expunerea la aceste alergene determină efecte sinergice, accentuând inflamația și disfuncția epitelială într-o măsură mai mare decât fiecare moleculă alergenă în parte.

Modelele experimentale in vitro cu culturi celulare epiteliale bronșice umane cultivate la interfața aer-lichid (ALI) au demonstrat că epiteliul expus la alergene este mai vulnerabil la stimuli nocivi, fenomen reflectat prin scăderea rezistenței electrice transepiteliale (TEER) și alterarea distribuției proteinelor de joncțiune, vizualizate prin studii de imunofluorescență.

MiRNA sunt molecule mici necodificatoare (18–25 nucleotide) care reglează expresia genică post-transcripțional, prin blocarea translației ARN mesager sau prin promovarea degradării acestuia. Ele controlează procese fundamentale precum proliferarea celulară, apoptoza, inflamația și răspunsul imun. Profilul de expresie miRNA este specific în funcție de fenotipul patologiei: miR-223 și miR-146a sunt asociate cu astmul neutrofilic (T2-low), în timp ce altele precum miR-21, miR-145 și miR-155, influențează inflamația, hipertrofia mușchiului neted și remodelarea căilor respiratorii din astmul de tip T2-high.

Biogeneza miRNA presupune mai multe etape succesive: transcripția de către ARN polimeraza II, procesarea nucleară prin complexul DROSHA-DGCR8, exportul în citoplasmă via Exportin-5 și clivajul final realizat de Dicer. MiRNA-ul matur este încărcat în complexul RISC, care recunoaște secvențele complementare de ARNm și modulează expresia genică. Datorită specificității lor și influenței asupra rețelelor moleculare, miRNA-urile sunt considerate biomarkeri promițători pentru diagnosticul molecular și terapia personalizată a astmului.

III. PARTEA SPECIALĂ

Această lucrare analizează interacțiunea complexă dintre alergenele de mediu, factorii alimentari și mecanismele moleculare care modulează patogeniza și exacerbările astmului alergic. Principalul accent este pus pe impactul sinergic al co-sensibilizării la acarienii din praful de casă și la polenul de ambrozia, în contextul unei diete bogate în fructoză, cu potențial obezogen. Studiul utilizează modele experimentale in vivo și in vitro pentru a explora modul în care HFrD contribuie la intensificarea severității astmului, prin promovarea obezității

abdominale, amplificarea inflamației locale și sistemice și creșterea hiperreactivității căilor respiratorii.

Un element central al cercetării îl reprezintă analiza efectelor co-sensibilizării la RW și HDM în paralel cu impactul obezitității induse de dieta bogată în fructoză. Rezultatele obținute demonstrează că expunerea combinată la cele două alergene agravează semnificativ severitatea astmului, manifestată printr-o hiperreactivitate marcată a căilor aeriene, niveluri crescute ale markerilor inflamatori și un status inflamator sistemic evident. Șobolanii din grupul co-sensibilizat au prezentat o reactivitate traheală semnificativ mai mare la metacolină, comparativ cu grupurile expuse exclusiv la un singur alergen, ceea ce sugerează un efect aditiv sau chiar sinergic în amplificarea răspunsului alergic.

Studiul evidențiază, de asemenea, efectele nocive ale dietei bogate în fructoză asupra inflamației alergice. Șobolanii hrăniți cu HFrD au dezvoltat o creștere semnificativă în greutate, o circumferință abdominală crescută și niveluri ridicate ale markerilor inflamatori sistemici (CRP, trigliceride, glicemie), precum și ale IgE. Co-sensibilizarea la RW și HDM a agravat suplimentar dislipidemia și inflamația sistemică, subliniind legătura strânsă dintre metabolismul alterat și răspunsurile imune exacerbate. Aceste constatări sugerează formarea unui fenotip astmatic mai sever, caracterizat prin inflamație accentuată, disfuncție pulmonară și remodelare tisulară.

Analizele histologice pulmonare au evidențiat o inflamație extinsă și modificări structurale caracteristice ale căilor respiratorii, cum ar fi hipertrofia mușchiului neted și îngroșarea peretelui bronșic, cele mai pronunțate fiind observate în grupul co-sensibilizat și cu dietă bogată în fructoză. Aceste constatări susțin ipoteza că interacțiunea dintre alergenele din mediu și HFrD nu doar amplifică inflamația, ci contribuie și la remodelarea cronică a căilor respiratorii, un fenomen definitoriu pentru astmul persistent.

La nivel celular, studiul utilizează sistemul Transwell pentru generarea unei interfețe aer-lichid, folosind celule epiteliale bronșice umane normale (NHBE), în vederea evaluării impactului expunerii la un singur alergen comparativ cu expunerea combinată la alergene asupra integrității barierei epiteliale. Această interfață reproduce fidel condițiile fiziologice ale căilor respiratorii umane, oferind un model experimental relevant pentru investigarea modului în care alergenele interacționează cu epiteliul respirator. Pentru a evalua modificările funcției barierei epiteliale, au fost utilizate atât măsurători ale rezistenței electrice transepiteliale, cât și analize de imunofluorescență ale proteinelor de joncțiune strânsă, precum zonula occludens-1.

Rezultatele obținute indică faptul că expunerea la combinația de alergene (RW și HDM) determină o scădere semnificativă a TEER, cel mai accentuat declin fiind observat în grupurile tratate cu concentrații crescute ale ambelor extracte de alergene. Astfel, expunerea la RW 200 $\mu\text{g/mL}$ a redus TEER la $52,14\% \pm 4,88\%$ din valorile inițiale ($p = 0,0001$), în timp ce HDM 200 $\mu\text{g/mL}$ a indus o scădere și mai pronunțată, cu TEER ajungând la $47,87\% \pm 3,91\%$ ($p = 0,0001$), ceea ce indică o alterare mai accentuată a integrității barierei epiteliale. Totodată, expunerea concomitentă la RW și HDM la concentrația de 200 $\mu\text{g/mL}$ a agravat și mai mult afectarea barierei epiteliale, determinând o reducere a TEER până la $44,18\% \pm 6,19\%$ din valoarea inițială. Aceste date susțin ipoteza că expunerea combinată la alergene are un efect sinergic distructiv asupra barierei epiteliale, comparativ cu expunerea individuală.

În plus, analiza prin imunofluorescență a arătat că integritatea joncțiunilor strânse, reprezentată în cazul acesta de ZO-1, a fost semnificativ compromisă în grupurile cu expunerea la combinația de alergene. În grupul de control, aspectul distribuției ZO-1 a apărut continuă și bine definită de-a lungul marginilor celulare, reflectând integritatea conservată a barierei epiteliale. În schimb, expunerea la concentrații crescute de RW (50, 100 și 200 $\mu\text{g/mL}$) a indus o întrerupere dependentă de doză a expresiei ZO-1, caracterizată prin aspectul fragmentat al distribuției joncțiunilor strânse și reducerea intensității imunofluorescenței. Cele mai pronunțate modificări morfologice au fost observate în grupul HR 200 (RW + HDM la 200 $\mu\text{g/mL}$), care a prezentat o dezorganizare extinsă a joncțiunilor strânse, în conformitate cu reducerea marcată a TEER, indicând o permeabilitate epitelială crescută. Cele mai mari scăderi ale intensității imunofluorescenței, în raport cu controlul, au fost înregistrate în grupurile HR 200 ($11,47\% \pm 6,4\%$) și HDM 200 ($13,81\% \pm 6,33\%$), urmate de RW 200 ($19,18\% \pm 8,28\%$) și HR 100 ($21,05\% \pm 7,14\%$). În timp ce valorile TEER normalizate la 72 de ore reflectă cantitativ integritatea barierei, colorarea ZO-1 oferă o reprezentare vizuală complementară a arhitecturii joncțiunilor strânse. Aceste rezultate evidențiază efectele sinergice ale mai multor alergene în perturbarea funcției de barieră epitelială, care este o caracteristică cheie în patogeneza astmului alergic. Deteriorarea barierei epiteliale facilitează probabil pătrunderea alergenelor în căile respiratorii, exacerband și mai mult inflamația și răspunsurile imune.

Pe lângă investigațiile efectuate pe culturi celulare și analizele funcționale și histologice realizate pe șobolani, studiul explorează și rolul miRNA-urilor ca reglatori cheie ai inflamației și potențiale ținte terapeutice. Determinarea profilului miRNA-urilor implicate în căile patogenice asociate astmului oferă perspective valoroase asupra mecanismelor moleculare care stau la

baza răspunsului inflamator în astmul alergic. Mai multe miRNA-uri s-au evidențiat ca markeri de diagnostic importanți, corelați cu mecanisme fiziopatologice distincte ale acestei patologii. Astfel, miR-155 a fost constant supraexprimat, susținând rolul său în promovarea inflamației mediate de limfocitele Th2 și a remodelării căilor respiratorii, nivelurile de expresie corelându-se cu severitatea afecțiunii. Similar, miR-21 a fost asociat cu intensificarea inflamației alergice prin suprimarea căilor antiinflamatorii și amplificarea semnalizării IL-13. Scăderea expresiei miR-146a, un modulator critic al axelor NF- κ B și IRAK1/TRAF6, a fost corelată cu persistența inflamației. MiR-145-5p, supraexprimat în celulele musculaturii netede bronșice, a fost asociat cu hiperreactivitate bronșică crescută și hipersecreție de mucus. Niveluri crescute de miR-223 au fost observate în exacerbările acute ale astmul, reflectând o orientare către inflamația neutrofilică și un dezechilibru Th17/Th2. În schimb, membrii familiei let-7 au prezentat o expresie redusă în profilurile astmatice, sugerând pierderea funcțiilor lor protectoare în menținerea integrității barierei epiteliale și atenuarea stresului oxidativ. Împreună, acești markeri moleculari evidențiază potențialul miRNA-urilor specifice de a servi nu doar ca biomarkeri diagnostici, ci și ca indicatori ai endotipurilor de astm și ai progresiei bolii. Prin identificarea unor miRNA-uri noi care modulează căile inflamatorii și răspunsurile sistemului imun, studiul urmărește impactul asupra medicinei de precizie în managementul astmului alergic. Aceste constatări au implicații semnificative pentru dezvoltarea terapiilor țintite care pot aborda mai eficient interacțiunea complexă dintre expunerea la alergene, dietă și răspunsul imun alterat din astm.

Această lucrare aduce contribuții semnificative la înțelegerea mecanismelor prin care co-expunerea la alergene de mediu și o dietă bogată în fructoză amplifică severitatea astmului alergic. Rezultatele tezei evidențiază necesitatea unei abordări integrative în cercetarea astmului, care să includă atât influențele mediului extern, cât și pe cele metabolice, și subliniază potențialul terapiilor bazate pe miRNA în direcția medicinei personalizate. Astfel, teza deschide perspective promițătoare pentru dezvoltarea unor intervenții terapeutice inovatoare și eficiente în managementul astmului alergic.

IV. CONCLUZII FINALE

Cercetarea realizată în cadrul acestei teze de doctorat oferă o perspectivă amplă și detaliată asupra fiziopatologiei astmului alergic, evidențiind interacțiunea complexă dintre inflamația indusă de alergene, disfuncția barierei epiteliale, dereglările metabolice și alterările

răspunsului imun. Studiul demonstrează modul în care co-sensibilizarea la acarienii din praful de casă și polenul de ambrozia amplifică semnificativ severitatea astmului, conducând la o hiperreactivitate a căilor respiratorii semnificativ mai pronunțată comparativ cu expunerea la un singur alergen. În paralel, o dietă bogată în fructoză agravează manifestările clinice ale astmului prin promovarea obezității abdominale și prin intensificarea inflamației locale și sistemice.

Rezultatele indică faptul că expunerea concomitentă la cele două alergene conduce la o deteriorare marcată a integrității barierei epiteliale bronșice, prin activarea unor căi inflamatorii și proteolitice care compromit funcția de protecție a epiteliului și contribuie la escaladarea proceselor inflamatorii de la nivelul căilor respiratorii. Acest aspect reflectă caracterul sinergic al co-expunerii la alergene și relevanța sa în contextul scenariilor reale ale astmului alergic. În plus, studiul evidențiază implicarea activă a epiteliului bronșic în patogeniza bolii, aspect confirmat prin măsurători TEER și analize de imunofluorescență ale proteinelor joncțiunilor strânse.

Un alt element al cercetării îl reprezintă rolul miRNA, care acționează ca reglatori cheie în mecanismele moleculare ale astmului. MiRNA-uri specifice, precum miR-155, miR-21 și miR-145, sunt implicate în polarizarea imună, răspunsurile inflamatorii și remodelarea căilor respiratorii, prin modularea producției de citokine și a căilor de stres oxidativ. De asemenea, dereglarea expresiei acestor miRNA oferă potențialul de a fi utilizați ca biomarkeri pentru evaluarea severității și progresiei bolii. De exemplu, nivelurile crescute de miR-126 și miR-223 sunt asociate cu inflamația mediată de limfocitele de tip Th2 și Th17, în timp ce expresia scăzută a let-7a și miR-133a se corelează cu disfuncția pulmonară și hiperreactivitatea căilor respiratorii.

Această teză aduce în prim-plan și impactul factorilor de mediu, inclusiv alergenele și poluanții, asupra rețelelor de expresie ale miRNA-urilor, sugerând că aceștia pot influența apariția și severitatea exacerbărilor astmatice. Determinarea profilului acestor miRNA-uri deschide noi perspective înspre medicina de precizie, permițând definirea și identificarea endotipurilor specifice de astm și dezvoltarea unor intervenții terapeutice personalizate. Direcționarea terapeutică a miRNA-urilor, în special cele implicate în căile inflamatorii și de remodelare tisulară, reprezintă o abordare inovatoare cu potențial de a reduce inflamația și de a ameliora structura căilor respiratorii. Cu validări suplimentare, terapiile bazate pe miRNA ar putea deveni un pilon important în managementul personalizat al astmului.