

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

FACULTY OF MEDICINE

Department III – FUNCTIONAL SCIENCES

ELENA-LARISA ZBÎRCEA



PHD THESIS

**FROM AIRWAY EPITHELIAL BARRIER DISRUPTION TO
VASCULAR DYSFUNCTION: INTEGRATING MECHANISTIC
LINKS BETWEEN ASTHMA AND ATHEROSCLEROSIS**

- A B S T R A C T -

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. DR. CARMEN PANAITESCU

Timișoara

2026

I. INTRODUCTION

Allergic asthma is a complex, multifactorial inflammatory condition of the airways, defined by variable bronchial reactivity, dysregulated immune responses and progressive structural alterations. Although traditionally regarded as a disease confined to the respiratory tract, it is increasingly recognized as a systemic condition with significant metabolic and vascular implications. Persistent airway inflammation contributes to endothelial dysfunction and early atherogenic processes, supporting the concept of a functional lung–vascular axis that integrates respiratory and cardiovascular pathology within a shared immunometabolic model. Within this paradigm, the airway epithelium has emerged as a central regulator of immune homeostasis, functioning not only as a structural barrier but also as a dynamic immunological interface capable of sensing environmental stimuli and coordinating downstream inflammatory responses.

This thesis proposes a unified mechanistic model in which combined allergen exposure, particularly under conditions of metabolic stress, drives a coordinated cascade of epithelial, immunological and vascular alterations extending beyond the airway compartment. Disruption of epithelial barrier integrity is positioned as an early and initiating event, facilitating allergen penetration and amplifying immune activation. In real-life conditions, exposure to aeroallergens rarely occurs in isolation, with individuals frequently encountering multiple triggers simultaneously. These allergens possess intrinsic proteolytic or oxidative properties that alter tight junction organization and epithelial cohesion, leading to sustained barrier impairment and amplified inflammatory responses. These local alterations are accompanied by systemic inflammatory signatures, suggesting propagation of airway-derived signals toward the vascular compartment.

In parallel, metabolic stress represents an essential modifier of disease expression. Conditions such as obesity and high-fructose dietary intake promote dyslipidemia, chronic low-grade inflammation and immune dysregulation, thereby exacerbating both airway and systemic pathology. Recent advances also highlight the role of the gut microbiota as a key regulator of immunometabolic homeostasis, contributing to the conceptual model of the gut–lung–vascular axis. In addition, microRNAs emerge as essential post-transcriptional regulators of immune signaling, epithelial integrity and vascular remodeling.

Within this integrated context, the present thesis investigates the interplay between environmental allergen exposure, epithelial barrier dysfunction, metabolic stress, microbiota-driven immune modulation and microRNA-mediated regulation in the pathogenesis and systemic extension of allergic asthma.

This thesis is structured around four complementary research components that collectively investigate the mechanisms linking airway epithelial barrier dysfunction to systemic disease. The first experiment employs differentiated human bronchial epithelial cells to characterize the effects of single and combined aeroallergen exposure on epithelial integrity, integrating functional, structural and molecular analyses. The second study utilizes an *in vivo* experimental model to examine the combined impact of allergic airway inflammation and metabolic stress on vascular dysfunction, supporting the concept of a lung–vascular axis. The third component consists of a mechanistic synthesis of microbiota-driven immune modulation within the gut–lung–vascular axis, emphasizing its role in regulating epithelial and systemic inflammatory responses. The fourth study provides an integrative analysis of shared microRNA-mediated regulatory pathways involved in epithelial barrier function, immune signaling and vascular remodeling. Together, these studies provide a multilevel and integrative approach for understanding the pathogenesis and systemic extension of allergic asthma.

II. GENERAL PART

The airway epithelium represents a highly specialized and dynamic structure that serves as both a physical barrier and an active regulator of immune homeostasis. Structurally, it is composed of multiple differentiated cell types, including ciliated, goblet, basal, club, tuft and pulmonary neuroendocrine cells, each contributing to airway integrity and defense. Coordinated intercellular junctions, particularly tight junctions formed by proteins such as occludin, claudins and zonula occludens (ZO-1), play a critical role in maintaining epithelial cohesion and regulating paracellular permeability. In parallel, mucociliary clearance mechanisms ensure the removal of inhaled particles and pathogens, thereby preserving airway sterility and function.

Beyond its structural role, the airway epithelium functions as a central immunological interface, capable of detecting environmental stimuli through pattern-recognition receptors such as Toll-like receptors and initiating immune responses through the secretion of cytokines, chemokines and epithelial-derived alarmins, including IL-25, IL-33 and thymic stromal lymphopoietin. These mediators activate dendritic cells and innate lymphoid cells, promoting the differentiation and recruitment of T helper cell subsets, particularly Th2 cells and driving the production of key cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13. These signaling cascades orchestrate hallmark features of allergic asthma, including eosinophilic inflammation, IgE synthesis, mucus hypersecretion and airway remodeling.

Asthma is characterized by considerable heterogeneity, encompassing multiple phenotypes and endotypes that reflect distinct immunopathological mechanisms. Type 2-high inflammation represents the most extensively studied endotype, whereas non-type 2 inflammation involves neutrophilic or mixed immune responses associated with more severe and treatment-resistant disease forms. This heterogeneity is influenced by a complex interplay between genetic predisposition, environmental exposures and systemic factors, including metabolic status. The transition from phenotype-based classification toward endotype-driven approaches has enabled a more precise understanding of disease mechanisms and supports the development of targeted therapeutic strategies.

Epithelial barrier dysfunction has emerged as a central event in asthma pathogenesis. Exposure to aeroallergens leads to disruption of tight junction integrity, increased epithelial permeability and enhanced translocation of allergens into subepithelial compartments, where they interact with immune cells and amplify inflammatory responses. This process establishes a self-reinforcing cycle in which epithelial damage and immune activation perpetuate each other, contributing to chronic disease progression. Importantly, cumulative exposure to multiple allergens, such as house dust mites (HDM) and ragweed (RW) pollen, may produce synergistic-like effects, resulting in more severe epithelial injury and sustained barrier impairment compared to single-allergen exposure.

In addition to local airway alterations, asthma is increasingly recognized as a systemic disease with metabolic and vascular components. Obesity, insulin resistance and dyslipidemia are frequently associated with increased asthma severity and reduced therapeutic responsiveness. Adipose tissue-derived inflammatory mediators, together with airway-derived cytokines, contribute to a chronic low-grade inflammatory state that extends beyond the lung. These systemic inflammatory processes promote endothelial activation, oxidative stress and vascular dysfunction, thereby contributing to the development of atherosclerosis. This interconnected pathology supports the concept of a functional lung–vascular axis linking respiratory and cardiovascular disease.

The gut microbiota plays a fundamental role in modulating immune and metabolic homeostasis. Dysbiosis, characterized by alterations in microbial diversity and composition, has been associated with increased epithelial permeability, systemic inflammation and immune imbalance. Microbial metabolites, particularly short-chain fatty acids, exert anti-inflammatory and immunoregulatory effects, influencing both airway and vascular responses. These interactions have led to the conceptualization of the gut–lung–vascular axis as an integrative model for understanding chronic inflammatory diseases.

At the molecular level, microRNAs represent major determinants of post-transcriptional regulation. These small non-coding RNAs modulate gene expression involved in immune signaling, epithelial integrity and vascular remodeling. Dysregulated microRNA expression has been implicated in both asthma and atherosclerosis, supporting the existence of shared regulatory pathways. Through their ability to coordinate multiple signaling networks, microRNAs serve as key mediators linking environmental exposure to cellular and systemic responses and represent promising biomarkers and therapeutic targets.

III. SPECIAL PART

The present doctoral research employs a comprehensive, multilevel and multimodal experimental design to investigate the complex interactions between environmental allergen exposure, epithelial barrier dysfunction, metabolic stress and systemic vascular alterations. By integrating *in vivo* experimental models with advanced *in vitro* epithelial systems and molecular analyses, this work enables a detailed characterization of disease mechanisms across functional, structural and regulatory dimensions.

At the epithelial level, the *in vitro* component employed differentiated normal human bronchial epithelial cells cultured at the air–liquid interface, a model that closely reproduces the structural and functional characteristics of the human airway epithelium. Exposure to allergen extracts at multiple concentrations enabled the evaluation of dose-dependent effects and combined allergen interactions on epithelial barrier integrity.

Functional assessment using transepithelial electrical resistance and real-time impedance monitoring revealed a characteristic biphasic response, consisting of an early transient increase in barrier resistance followed by a sustained decline indicative of progressive barrier disruption. This late-phase impairment was most pronounced in combined exposure conditions, which consistently exhibited the greatest reduction in epithelial resistance and the lowest recovery capacity over time. Quantitative analyses, including endpoint measurements and cumulative response evaluation, confirmed that co-exposure induces a significantly greater and more persistent impairment compared to individual allergens.

Structural analysis by immunofluorescence microscopy demonstrated marked disruption of tight junction architecture, with occludin staining revealing fragmentation and discontinuity of intercellular junctions. These structural alterations closely paralleled functional impairment, supporting a direct relationship between tight junction integrity and epithelial barrier function.

At the molecular level, transcriptional analyses revealed coordinated dysregulation of genes involved in innate immune signaling and inflammasome activation. Combined allergen exposure was associated with broader and more pronounced transcriptional alterations, suggesting a stress-associated epithelial phenotype characterized by impaired immune-regulatory and repair-related transcriptional responses under cumulative allergen burden.

The *in vivo* component was conducted using Sprague–Dawley rats within a controlled experimental framework integrating allergic asthma induction, metabolic stress (through a high-fructose diet) and/or pharmacological intervention (rosuvastatin treatment). Allergic asthma was induced using a well-established ovalbumin (OVA) sensitization and challenge protocol.

In parallel, a subgroup of animals was maintained on a high-fructose diet for 12 weeks, achieved through supplementation of drinking water with 30% fructose, leading to metabolic dysfunction characterized by increased body weight, dyslipidemia, hyperglycemia and systemic low-grade inflammation. To investigate potential therapeutic modulation, rosuvastatin was administered to designated groups throughout the experimental period to ensure sustained pharmacological effects. Rosuvastatin was included as a pharmacological modulator of the inflammatory–vascular interface. This integrative design, encompassing control, allergic asthma, metabolic dysfunction and combined conditions, with and without statin treatment, enabled a comprehensive evaluation of the interactions between airway inflammation, metabolic stress and vascular dysfunction, as well as the capacity of pharmacological intervention to modulate this interconnected pathophysiological axis.

Comprehensive metabolic profiling revealed the development of a distinct immunometabolic phenotype in high-fructose diet groups, characterized by increased body weight, abdominal circumference, hyperglycemia, hypertriglyceridemia and elevated atherogenic indices. These metabolic alterations were accompanied by increased systemic inflammatory markers, including elevated C-reactive protein levels, and were strongly associated with elevated serum IgE levels in allergen-exposed groups. This association supports a mechanistic link between allergic sensitization and systemic inflammation, highlighting the integration of immune and metabolic pathways in asthma pathophysiology.

Histopathological examination of lung tissue demonstrated significant inflammatory cell infiltration, bronchial wall thickening, epithelial damage and features of airway remodeling, including smooth muscle hypertrophy. These structural alterations were most pronounced in allergic asthma groups that were also exposed to a high-fructose diet, indicating that combined environmental and metabolic stressors drive more severe and persistent pulmonary tissue damage.

Vascular reactivity studies further revealed impaired endothelium-dependent vasorelaxation in models subjected to allergen exposure and metabolic stress, indicating early endothelial dysfunction. These functional alterations were accompanied by histological changes in the aortic wall, including structural remodeling consistent with early vascular dysfunction. The coexistence of systemic inflammation, metabolic disturbance and vascular impairment within the same experimental model provides strong evidence for a pathogenic continuum linking asthma and atherosclerosis, supporting the concept of a lung–vascular axis.

Beyond local airway mechanisms, the research further incorporates the role of microbiota-driven immune modulation within the broader context of the gut–lung–vascular axis. The analysis highlights that dysbiotic states are characterized by reduced abundance of short-chain fatty acid–producing taxa and increased levels of pro-inflammatory mediators, including lipopolysaccharide and trimethylamine N-oxide. These alterations are associated with impaired barrier integrity, enhanced systemic inflammatory signaling and metabolic imbalance, providing a mechanistic basis for the parallel development of allergic airway disease and vascular pathology. The data support a model in which microbiota-derived signals contribute to the amplification and persistence of inflammatory responses across organ systems. These observations reinforce the concept that airway pathology cannot be fully understood in isolation from systemic microbial and metabolic regulation.

At the molecular level, particular emphasis is placed on microRNAs as key post-transcriptional regulators coordinating immune responses, epithelial barrier function and vascular remodeling. The analysis identifies miR-21 and miR-155 as consistently associated with pro-inflammatory signaling and tissue remodeling, while miR-146a functions as a negative regulator of TLR/NF- κ B–dependent pathways. In addition, miR-223 is implicated in the modulation of innate immune responses and members of the let-7 family are associated with epithelial differentiation and barrier maintenance. These regulatory signatures converge on pathways involved in cytokine signaling, endothelial activation and smooth muscle cell behavior, supporting the existence of shared molecular mechanisms underlying both airway and vascular disease processes.

Taken together, these studies provide a comprehensive mechanistic perspective on allergic asthma, showing how environmental, metabolic, microbial and molecular factors converge to shape both local airway pathology and systemic vascular dysfunction. By combining *in vivo*, *in vitro* and translational perspectives, this work advances the understanding of asthma as a systemic disease. The identified epithelial, metabolic and regulatory alterations may also contribute to future biomarker-guided stratification of patients with complex allergic disease.

IV. FINAL CONCLUSIONS

This doctoral research establishes an integrated mechanistic model in which epithelial barrier dysfunction represents a central initiating event that amplifies immune activation and sustains chronic inflammation. Combined exposure to house dust mites and ragweed pollen produces greater-than-additive effects on epithelial integrity, airway responsiveness and inflammatory burden, emphasizing the pathogenic relevance of cumulative environmental exposure.

Metabolic stress further exacerbates these alterations, reinforcing the concept of asthma as a systemic immunometabolic disorder. The parallel demonstration of endothelial dysfunction alongside airway pathology provides direct experimental support for a functional lung–vascular axis linking asthma to atherogenesis. Within this framework, microbiota-driven immune modulation emerges as an essential upstream regulator, influencing epithelial integrity, systemic inflammation and metabolic homeostasis. The integration of microbiota-related mechanisms, together with microRNA-mediated regulation, frames a complex, multilayered pathogenic network that governs disease progression and systemic extension.

Collectively, these findings define allergic asthma as a barrier-centered, immunometabolic and systemically integrated disorder, in which epithelial dysfunction represents the early pathogenic event linking environmental exposures to vascular pathology.

These findings support the development of personalized, endotype-informed therapeutic strategies targeting epithelial resilience, immunometabolic dysregulation and vascular consequences, and provide a strong foundation for future translational research in precision medicine. Overall, this thesis contributes to the reconceptualization of allergic asthma as a barrier-centered, systemically integrated disease amenable to clinical stratification.

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

ELENA-LARISA ZBÎRCEA



TEZĂ DE DOCTORAT

**DE LA ALTERAREA BARIEREI EPITELIALE BRONȘICE
LA DISFUNȚIA VASCULARĂ: MECANISME INTEGRATIVE
CARE MODULEAZĂ INTERCONEXIUNEA DINTRE ASTM ȘI
ATEROSCLEROZĂ**

- R E Z U M A T -

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CARMEN PANAITESCU

Timișoara

2026

I. INTRODUCERE

Astmul alergic reprezintă o afecțiune inflamatorie complexă și multifactorială a căilor respiratorii, caracterizată prin reactivitate bronșică variabilă, dereglarea răspunsului imun și modificări structurale progresive. Deși în mod tradițional a fost considerată o boală limitată la nivelul tractului respirator, astmul este din ce în ce mai recunoscut ca o afecțiune sistemică, cu implicații metabolice și vasculare semnificative. Inflamația persistentă a căilor respiratorii contribuie la disfuncția endotelială și la inițierea proceselor aterogene precoce, susținând conceptul unui ax funcțional plămân–vascular, care integrează patologia respiratorie și cardiovasculară într-un cadru imunometabolic comun. În acest context, epiteliul căilor respiratorii a devenit recunoscut ca un regulator central al homeostaziei imune, funcționând nu doar ca o barieră structurală, ci și ca o interfață imunologică dinamică, capabilă să detecteze stimuli din mediul extern și să coordoneze răspunsurile inflamatorii ulterioare.

Prezenta teză propune un cadru mecanistic unificat, demonstrând că expunerea combinată la alergene, în special în condiții de stres metabolic, determină o cascadă coordonată de modificări epiteliale, imunologice și vasculare, care depășesc compartimentul căilor respiratorii. Alterarea integrității barierei epiteliale este considerată un eveniment precoce și inițiator, facilitând penetrarea alergenelor și amplificând activarea imună. În condițiile reale de mediu, expunerea la aeroalergene apare rareori izolat, indivizii fiind frecvent expuși simultan la multipli factori declanșatori. Aceste alergene prezintă proprietăți proteolitice sau oxidative intrinseci, care modifică organizarea joncțiunilor strânse și coeziunea epitelială, conducând la disfuncție persistentă a barierei și la amplificarea răspunsurilor inflamatorii. Aceste modificări locale sunt însoțite de profiluri inflamatorii sistemice, sugerând propagarea semnalelor generate la nivelul căilor respiratorii către compartimentul vascular.

În paralel, stresul metabolic reprezintă un factor esențial implicat în modularea expresiei clinice a bolii. Condiții precum obezitatea și aportul crescut de fructoză favorizează dislipidemia, inflamația cronică de grad scăzut și dereglarea răspunsurilor imune, exacerbând astfel atât patologia respiratorie, cât și pe cea sistemică. Progresele recente evidențiază, de asemenea, rolul microbiotei intestinale ca regulator major al homeostaziei imunometabolice, contribuind la definirea conceptului de ax intestin–plămân–vascular. În plus, microARN-urile sunt recunoscute ca regulatori cheie post-transcripționali ai semnalizării imune, integrității epiteliale și remodelării vasculare.

În acest context integrativ, prezenta teză investighează interacțiunea dintre expunerea la alergene din mediu, disfuncția barierei epiteliale, stresul metabolic, modularea imună mediată de microbiotă și reglarea post-transcripțională dependentă de microARN-uri în patogeneza și extensia sistemică a astmului alergic.

Teza este structurată în jurul a patru componente de cercetare complementare, care investighează mecanismele ce leagă disfuncția barierei epiteliale bronșice de patologia sistemică. Primul experiment utilizează celule epiteliale bronșice umane diferențiate pentru a caracteriza efectele expunerii la aeroalergene, individual și în combinație, asupra integrității epiteliale, prin analize funcționale, structurale și moleculare. Al doilea studiu utilizează un model experimental in vivo pentru a evalua impactul combinat al inflamației alergice și al stresului metabolic asupra disfuncției vasculare, susținând conceptul de ax plămân–vascular. A treia lucrare explorează modularea imună dependentă de microbiotă în cadrul axului intestin–plămân–vascular, evidențiind rolul acesteia în reglarea răspunsurilor inflamatorii epiteliale și sistemice. Al patrulea studiu investighează mecanismele comune de reglare mediate de microARN-uri implicate în funcția barierei epiteliale, semnalizarea imună și remodelarea vasculară. Împreună, aceste studii oferă un cadru integrativ și multidimensional pentru înțelegerea patogenezei și extensiei sistemice a astmului alergic.

II. PARTE GENERALĂ

Epiteliul căilor respiratorii reprezintă o structură specializată și dinamică, care funcționează atât ca barieră fizică, cât și ca regulator activ al homeostaziei imune. Din punct de vedere structural, acesta este alcătuit din multiple tipuri celulare diferențiate, incluzând celule ciliate, celule caliciforme, celule bazale, celule club, celule tuft și celule neuroendocrine pulmonare, fiecare contribuind la menținerea integrității și funcției de apărare a căilor respiratorii. Joncțiunile intercelulare coordonate, în special joncțiunile strânse formate din proteine precum ocludina, claudinele și proteinele zonula occludens (ZO-1), au un rol esențial în menținerea coeziunii epiteliale și în reglarea permeabilității paracelulare. În paralel, mecanismele de clearance mucociliar asigură eliminarea particulelor inhalate și a agenților patogeni, contribuind la menținerea sterilității și funcționalității căilor respiratorii.

Dincolo de rolul său structural, epiteliul căilor respiratorii funcționează ca o interfață imunologică centrală, capabilă să detecteze stimuli de mediu prin intermediul receptorilor de recunoaștere a pattern-urilor, precum receptorii Toll-like, și să inițieze răspunsuri imune prin secreția de citokine, chemokine și alarmine epiteliale, inclusiv IL-25, IL-33 și limfopoietina stromală timică (TSLP). Acești mediatori activează celulele dendritice și celulele limfoide înăscute, promovând diferențierea și recrutarea subpopulațiilor de limfocite T helper, în

special Th2, și stimulând producția de citokine-cheie precum IL-4, IL-5 și IL-13. Aceste cascade de semnalizare coordonează caracteristicile definitorii ale astmului alergic, incluzând inflamația eozinofilică, sinteza de IgE, hipersecreția de mucus și remodelarea căilor respiratorii.

Astmul se caracterizează printr-o heterogenitate semnificativă, incluzând multiple fenotipuri și endotipuri care reflectă mecanisme imunopatologice distincte. Inflamația de tip 2 (T2-high) reprezintă endotipul cel mai studiat, în timp ce inflamația non-T2 implică răspunsuri neutrofile sau mixte, asociate frecvent cu forme mai severe și mai rezistente la tratament. Această heterogenitate este determinată de interacțiuni complexe între predispoziția genetică, expunerile de mediu și factorii sistemici, precum și statusul metabolic. Tranziția de la clasificarea bazată pe fenotip către abordări bazate pe endotipuri a permis o înțelegere mai precisă a mecanismelor moleculare ale astmului alergic și susține dezvoltarea strategiilor terapeutice țintite și personalizate.

Disfuncția barierei epiteliale a fost recunoscută ca un eveniment central în patogeneza astmului. Expunerea la aeroalergene determină perturbarea integrității joncțiunilor strânse, creșterea permeabilității epiteliale și facilitarea translocării alergenelor către compartimentul subepitelial, unde interacționează cu celulele imune și amplifică răspunsurile inflamatorii. Acest proces inițiază un cerc vicios în care alterarea integrității epiteliale și activarea imună se auto-susțin, contribuind la progresia cronică a bolii. Totodată, expunerea cumulativă la multiple alergene, precum acarienii din praful de casă (HDM) și polenul de ambrozie (RW), poate determina efecte mai accentuate, realizând o disrupție mai pronunțată a integrității epiteliale și o disfuncție a barierei mai persistentă comparativ cu expunerea la un singur alergen.

Pe lângă modificările locale de la nivelul căilor respiratorii, astmul este din ce în ce mai recunoscut ca o afecțiune cu implicații sistemice, exercitând efecte asupra homeostaziei metabolice, funcției vasculare și altor mecanisme biologice, în mare măsură prin persistența inflamației cronice. Obezitatea, rezistența la insulină și dislipidemia sunt frecvent asociate cu forme mai severe de astm și cu un răspuns terapeutic redus. Mediatorii inflamatori proveniți din țesutul adipos, împreună cu citokinele secretate la nivelul căilor respiratorii, contribuie la menținerea unui status inflamator cronic de grad scăzut, care se extinde dincolo de compartimentul pulmonar. Aceste procese inflamatorii sistemice favorizează activarea endotelială, amplifică stresul oxidativ și induc disfuncție vasculară, contribuind astfel la inițierea și progresia aterosclerozei. Această relație patogenică susține existența unui ax funcțional plămân–vascular, ce conectează afecțiunile respiratorii cu bolile cardiovasculare.

Microbiota intestinală joacă un rol esențial în modularea homeostaziei imune și metabolice. Disbioza, caracterizată prin modificări ale diversității și compoziției microbiene, a fost asociată cu creșterea permeabilității epiteliale, inflamație sistemică și dezechilibru imun. Metaboliții microbieni, în special acizii grași cu lanț scurt, exercită efecte antiinflamatorii și imunoreglatoare, influențând atât răspunsurile la nivelul căilor respiratorii, cât și pe cele vasculare. Aceste interacțiuni au condus la formularea conceptului de ax intestin–plămân–vascular ca model integrativ pentru înțelegerea bolilor inflamatorii cronice.

La nivel molecular, microARN-urile ocupă un rol central în reglarea post-transcripțională a expresiei genice. Aceste molecule mici de ARN necodant modulează expresia genică implicată în semnalizarea imună, integritatea epitelială și remodelarea vasculară. Dereglarea expresiei microARN-urilor a fost implicată atât în astm, cât și în ateroscleroză, susținând existența unor căi de reglare comune. Prin capacitatea lor de a coordona multiple rețele de semnalizare, microARN-urile acționează ca mediatori cheie care leagă expunerile de mediu de răspunsurile celulare și sistemice și reprezintă biomarkeri promițători și potențiale ținte terapeutice.

III. PARTE SPECIALĂ

Prezenta cercetare doctorală utilizează un design experimental comprehensiv, multidimensional și multimodal pentru a investiga interacțiunile complexe dintre expunerea la alergene de mediu, disfuncția barierei epiteliale, stresul metabolic și modificările vasculare sistemice. Prin integrarea modelelor experimentale *in vivo* cu sisteme epiteliale *in vitro* avansate și analize moleculare, acest demers permite caracterizarea detaliată a mecanismelor patologice la nivel funcțional, structural și reglator.

La nivel epitelial, componenta *in vitro* a utilizat culturi de celule epiteliale bronșice umane normale diferențiate la interfața aer–lichid, un model care reproduce caracteristicile structurale și funcționale ale epiteliului căilor respiratorii. Expunerea la extracte alergene în concentrații multiple a permis evaluarea efectelor dependente de doză și a interacțiunilor dintre alergene asupra integrității barierei epiteliale.

Evaluarea funcțională prin măsurarea rezistenței electrice transepiteliale și monitorizarea impedanței celulare în timp real a evidențiat un răspuns bifazic caracteristic, constând într-o creștere tranzitorie precoce a rezistenței barierei, urmată de o scădere susținută, sugestivă pentru o disrupție progresivă a acesteia. Această afectare tardivă a fost cea mai pronunțată în condițiile de expunere combinată, care au prezentat constant cea mai mare reducere a rezistenței epiteliale și cea mai scăzută capacitate de recuperare în timp. Analizele funcționale ale integrității barierei epiteliale au confirmat că impactul este

semnificativ mai mare și mai persistent pentru co-expunerea la alergene comparativ cu expunerea la alergene individuale.

Analiza structurală prin microscopie de imunofluorescență a evidențiat perturbări marcate ale arhitecturii joncțiunilor strânse, colorația pentru ocludină demonstrând fragmentarea și discontinuitatea joncțiunilor intercelulare. Aceste modificări structurale au fost în strânsă corelație cu alterările funcționale, susținând o relație directă între integritatea joncțiunilor și funcția barierei epiteliale.

La nivel molecular, analizele de expresie genică au evidențiat o dereglare coordonată a genelor implicate în semnalizarea imună înăscută și activarea inflamozomului. Expunerea combinată la alergene a fost asociată cu modificări transcripționale mai extinse și mai pronunțate, sugerând instalarea unei stări de stres epitelial și reducerea capacității de reglare în condițiile co-expunerii la HDM și RW.

Componenta *in vivo* a fost realizată pe șobolani Sprague–Dawley, într-un cadru experimental controlat care a integrat inducerea astmului alergic, stresul metabolic (prin dietă îmbogățită cu fructoză) și intervenția farmacologică (tratament cu rosuvastatină). Astmul alergic a fost indus utilizând un protocol de sensibilizare și provocare cu ovalbumină.

În paralel, un subgrup de animale a fost supus unei diete bogate în fructoză timp de 12 săptămâni, realizată prin suplimentarea apei de băut cu 30% fructoză, determinând apariția unui fenotip de disfuncție metabolică caracterizat prin creștere ponderală, dislipidemie, hiperglicemie și inflamație sistemică de grad scăzut. Pentru evaluarea unei posibile intervenții terapeutice, rosuvastatina a fost administrată grupurilor desemnate pe toată durata experimentului. Rosuvastatina a fost inclusă ca modulator farmacologic al interfeței inflamator–vasculare. Acest design integrativ, incluzând grupuri control, astm alergic, disfuncție metabolică și condiții combinate, cu și fără tratament cu rosuvastatină, a permis evaluarea interacțiunilor dintre inflamația căilor respiratorii, stresul metabolic și disfuncția vasculară, precum și a potențialului de modulare farmacologică a acestui ax fiziopatologic interconectat.

Profilul metabolic a evidențiat dezvoltarea unui fenotip imunometabolic distinct în grupurile supuse dietei bogate în fructoză, caracterizat prin creșterea greutatei corporale, a circumferinței abdominale, hiperglicemie, hipertrigliceridemie și indici aterogeni crescuți. Aceste modificări metabolice au fost însoțite de creșterea markerilor inflamatori sistemici, inclusiv proteina C reactivă, și au fost asociate cu niveluri crescute de IgE seric în grupurile cărora li s-a indus astmul alergic. Această asociere susține existența unei legături mecanistice între sensibilizarea alergică și inflamația sistemică, evidențiind interacțiunea dintre căile imune și cele metabolice în patofiziologia astmului.

Examinarea histopatologică a țesutului pulmonar a evidențiat infiltrat inflamator semnificativ, îngroșarea peretelui bronșic, lezarea epitelului și caracteristici de remodelare a căilor respiratorii, inclusiv hipertrofia musculaturii netede. Aceste modificări au fost cele mai pronunțate în grupurile cu astm alergic asociat cu dietă bogată în fructoză, sugerând că factorii de stres combinați determină leziuni pulmonare mai severe și mai persistente.

Studiile de reactivitate vasculară au demonstrat, de asemenea, o afectare a vasorelaxării dependente de endoteliu în modelele supuse expunerii la alergene și stres metabolic, indicând disfuncție endotelială precoce. Aceste modificări funcționale au fost însoțite de alterări histologice la nivelul peretelui aortic, incluzând remodelare structurală. Coexistența inflamației sistemice, a disfuncției metabolice și a afectării vasculare în cadrul aceluiași model experimental furnizează dovezi solide pentru existența unui continuum patogenic între astm și ateroscleroză, susținând conceptul de ax plămân–vascular.

Dincolo de mecanismele locale, cercetarea integrează și rolul modulării imune dependente de microbiotă în cadrul axului intestin–plămân–vascular. Analiza evidențiază faptul că stările de disbioză se caracterizează prin reducerea bacteriilor producătoare de acizi grași cu lanț scurt și creșterea mediatorilor proinflamatori, precum lipopolizaharidul și trimetilamina N-oxid. Aceste modificări sunt asociate cu alterarea integrității barierei, amplificarea inflamației sistemice și dezechilibru metabolic, oferind o bază mecanistică pentru dezvoltarea paralelă a patologiei respiratorii alergice și a celei vasculare. Aceste observații susțin ideea că patologia căilor respiratorii nu poate fi înțeleasă adecvat în absența contextului sistemic microbial și metabolic.

La nivel molecular, un rol important revine microARN-urilor ca reglatori post-transcripționali ai răspunsurilor imune, integrității epiteliale și remodelării vasculare. Analiza evidențiază implicarea miR-21 și miR-155 în promovarea inflamației și remodelării tisulare, rolul miR-146a ca reglator negativ al semnalizării dependente de TLR/NF-κB, precum și implicarea miR-223 în reglarea răspunsului imun înăscut și a familiei let-7 în diferențierea epitelială și menținerea integrității barierei. Aceste semnături converg asupra unor căi comune implicate în semnalizarea citokinică, activarea endotelială și comportamentul celulelor musculare netede.

În ansamblu, aceste studii oferă o perspectivă mecanistică integrativă a astmului alergic, demonstrând modul în care factorii de mediu, metabolici, microbieni și moleculari converg în modelarea atât a patologiei locale la nivelul căilor respiratorii, cât și a disfuncției vasculare sistemice. Prin integrarea perspectivelor *in vivo*, *in vitro* și translaționale, această lucrare contribuie la redefinirea astmului ca boală sistemică și propune un cadru robust pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate.

IV. CONCLUZII FINALE

Această cercetare doctorală definește un cadru mecanistic integrat în care disfuncția barierei epiteliale reprezintă un eveniment central și inițiator, capabil să amplifice activarea imună și să susțină inflamația cronică. Expunerea combinată la acarienii din praful de casă și la polenul de ambrozie determină efecte mai pronunțate asupra integrității epiteliale, reactivității căilor respiratorii și a gradului de inflamație locală, evidențiind relevanța patogenică a expunerii cumulative la factori de mediu.

Stresul metabolic amplifică aceste modificări, susținând conceptualizarea astmului ca o afecțiune imunometabolică sistemică. Demonstrarea concomitentă a disfuncției endoteliale, în paralel cu patologia respiratorie, oferă suport experimental direct pentru existența unui ax funcțional plămân–vascular care leagă astmul de procesele aterosclerotice.

În acest context, modularea imună dependentă de microbiotă se conturează ca un reglator major, cu impact asupra integrității epiteliale, inflamației sistemice și homeostaziei metabolice. Integrarea mecanismelor legate de microbiotă, împreună cu reglarea mediată de microARN-uri, conturează o rețea patogenică complexă, multistratificată, care determină progresia bolii și extensia sa sistemică.

În ansamblu, aceste rezultate definesc astmul alergic ca o afecțiune centrată pe disfuncția barierei epiteliale, cu substrat imunometabolic și integrare sistemică, în care alterarea epiteliului reprezintă evenimentul inițial ce conectează expunerile de mediu cu patologia vasculară.

Aceste date susțin dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate, ghidate de endotip, care vizează atât componenta respiratorie, cât și pe cea vasculară a bolii, și oferă o bază solidă pentru viitoare cercetări translaționale în domeniul medicinei de precizie. În ansamblu, această teză contribuie la redefinirea astmului alergic ca o boală centrată pe disfuncția barierei epiteliale, integrată sistemic și susceptibilă de stratificare clinică.