
TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Semnătura imunologică și rolul mastocitului în urticaria cronică – implicații în evidențierea unor noi ținte terapeutice

Doctorand **Carmen-Teodora Dobrican**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Gabriela Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Cadru general	17
1.1. Definiții și clasificare	17
1.2. Epidemiologie și prevalență	17
1.3. Evoluție naturală și prognostic	18
1.4. Impactul asupra calității vieții bolnavilor	19
2. Etiologie și patogeneză	21
2.1. Caracteristicile histopatologice ale pielii	21
2.2. Teoria autoimunității	22
2.3. Mastocitele în UCS	27
2.4. Citokine	28
2.5. Factori genetici	32
3. Diagnostic	35
3.1. Istoric	35
3.2. Diagnosticul clinic	36
3.3. Diagnosticul paraclinic	36
3.4. Diagnosticul diferențial	38
4. Instrumente de evaluare/Scoruri și scale clinice	41
4.1. UAS și AAS	41
4.2. UCT	42
4.3. DLQI	42
5. Tratamente actuale	
5.1. Principii generale și obiective	43
5.2. Tratament farmacologic	44
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	51
3. Studiul 1 - Exacerbarea Urticariei Cronice Spontane ca Urmare a Bolii COVID-19: Un Studiu Retrospectiv Românesc	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	54
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	64

4. Studiul 2 - IL-31 - Interleukina Pruritului - Valori Serice și Impact Clinic în Urticaria Cronică Spontană - Un Studiu Retrospectiv Românesc	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	67
4.4. Rezultate	70
4.5. Discuții	79
4.6. Concluzii	83
5. Studiul 3 - Triada Alarminelor - IL-25, IL-33 și TSLP - Nivelurile serice și implicațiile lor clinice în urticaria cronică spontană	85
5.1. Introducere	85
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	85
5.3. Material și metodă	87
5.4. Rezultate	90
5.5. Discuții	104
5.6. Concluzii	108
6. Studiul 4 - Explorarea impactului polimorfismului genetic al IL-33 (rs1929992) asupra susceptibilității la Urticaria Cronică și asocierea acestuia cu Interleukina-33 serică	109
6.1. Introducere	109
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	111
6.3. Material și metodă	111
6.4. Rezultate	115
6.5. Discuții	120
6.6. Concluzii	123
7. Discuții generale	125
8. Concluzii generale	127
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	129
REFERINȚE	131

CUVINTE CHEIE: urticaria cronică, mastocite, citokine, alarmine, prurit, polimorfisme, ținte terapeutice

INTRODUCERE

Urticaria cronică (UC) este o patologie cutanată cu un mecanism fiziopatologic și imunologic complex, care nu este pe deplin deslușit la ora actuală. Aceasta se caracterizată prin erupții cutanate maculopapulare, fugacee, recurente, însoțite sau nu de angioedem, care persistă mai mult de șase săptămâni. Afecțiunea aceasta impune o povară semnificativă asupra pacienților, afectând considerabil calitatea vieții și generând costuri substanțiale pentru sistemele de sănătate. Lucrarea de față explorează semnătura imunologică și rolul mastocitului în UC, cu o atenție specială acordată urticariei cronice spontane (UCS), și încearcă să identifice noi ținte terapeutice prin descifrarea unor mecanisme moleculare implicate în patogeneză.

UCS poate avea o etiologie multifactorială, și în ultimele decenii, teoria autoimunității a câștigat teren, sugerând că autoanticorpii direcționați împotriva receptorului FcεRI sau a IgE pot induce degranularea mastocitelor. Acest proces este crucial în dezvoltarea și menținerea simptomelor UCS. În plus, factorii genetici pot influența susceptibilitatea individuală la UCS, precum și răspunsul la tratament, însă aceste aspecte nu sunt încă suficient explorate.

Pandemia COVID-19 a adăugat un nou factor de complexitate acestei boli, observându-se o creștere a cazurilor noi de UCS și modificări ale simptomatologiei, în special cu agravare, la pacienții pre-existenți, posibil din cauza impactului viral asupra funcției sistemului imun și stresului asociat pandemiei. Această dinamică neașteptată a fost integrată în cercetarea tezei, oferind o perspectivă actualizată și relevantă asupra interacțiunii dintre infecțiile virale și patologia urticariei.

Această teză de doctorat urmărește să extindă înțelegerea actuală a mecanismelor imunologice și celulare implicate în UCS, explorând în mod specific rolul și reglarea mastocitelor. Se va pune un accent deosebit pe dinamica și rolul citokinelor implicate în UC, pentru a înțelege mai bine modul în care acestea contribuie la patogeneză UC și la menținerea simptomelor pe termen lung. În acest context, se vor analiza și implicațiile pandemiei COVID-19 asupra cercetării în domeniu și felul în care infecțiile virale pot activa mastocitele. Teza va încerca să definească noi ținte terapeutice care pot oferi un tratament mai eficient și mai personalizat pentru pacienții cu UCS, contribuind astfel la îmbunătățirea managementului acestei afecțiuni complexe și debilitante.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde informații din literatură, prezentate în cinci capitole.

Primul capitol al acestei părți cuprinde date despre stadiul actual al cunoașterii respectiv încadrarea și clasificarea urticariei cronice, continuând cu datele de epidemiologie și prevalență, evoluție naturală și prognostic și impactul asupra calității vieții. Conform ghidului revizuit în 2021 al Academiei Europene de Alergologie și Imunologie Clinică (EAACI), urticaria este o entitate clinică variabilă, cu multiple subtipuri, clasificate în urticarie acută și cronică, în funcție de durata simptomelor, și în spontană și inductibilă, în funcție de factorii declanșatori. UCS, care nu are un factor specific de declanșare, este subiectul discuției în această teză.

Al doilea capitol conține informații privind etiologia și patogeniza bolii insistându-se asupra caracteristicilor histopatologice din urticarie, asupra teoriei autoimunității, rolului pe care îl joacă bazofilele, mastocitele și citokinele dar și asupra factorilor genetici implicați. Mastocitul este considerat celula centrală în mecanismele fiziopatologice ale UC, cu activarea sa declanșată de diverși factori, inclusiv alergeni, infecții și stres fizic sau chimic. Eliberarea de histamină și alți mediatori inflamatori și vasoactivi de către mastocite provoacă simptomele tipice ale urticariei, cum ar fi erupția cutanată, pruritul și angioedemul. Recent, s-a observat că citokinele precum Interleukina-31 (IL-31), IL-25, IL-33 și limfopoietina timică stromală (TSLP) pot juca un rol crucial în exacerbarea și persistența simptomelor UC.

Al treilea capitol se referă la diagnosticul UCS și anume la diagnosticul clinic, paraclinic și diferențial în timp ce capitolul patru include date privind instrumentele de evaluare și scorurile scalare clinice. Diagnosticul se bazează predominant pe examinarea clinică și pe istoricul pacientului, însă, în anumite situații, poate fi completată de teste paraclinice, cum ar fi teste de provocare și determinări serologice. Evaluarea severității bolii și a impactului asupra calității vieții se realizează folosind instrumente validate, cum ar fi scorul activității urticariei (UAS) și indicele dermatologic al calității vieții (DLQI).

Capitolul cinci conține date referitoare la tratamentele actuale pornind de la principii generale, de la administrarea de antihistaminice la cea de omalizumab și la ciclosporina A dar și terapiile alternative posibile în această boală.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Cea de-a doua parte a tezei este formată din patru studii clinice, efectuate în timpul acestei cercetări doctorale, studii retrospective și caz martor, incluzând pacienți cu UCS și subiecți control, cu evaluări clinice, paraclinice și moleculare.

În primul studiu, obiectivul principal a fost evaluarea impactului pandemiei COVID-19 asupra dinamicii și incidenței urticariei dar și asupra comportamentului pe care îl are mastocitul în această afecțiune. Rezultatele obținute au arătat că pandemia de COVID-19 a adăugat un nou factor de complexitate în această boală, observându-se o creștere a cazurilor noi de urticarie și a indus modificări ale simptomatologiei la pacienții pre-existenți, posibil din cauza impactului infecției virale asupra funcției sistemului imun

și al stresului asociat pandemiei. S-a constatat ca mastocitele, celule cheie în răspunsul imun efector în cazul UCS pot juca un rol și în patogeniza COVID-19 și alte sindroame inflamatorii post-infecțioase, prin eliberarea mediatorilor proinflamatori. Astfel, infecția cu COVID-19 poate agrava simptomele UCS, mai ales în cazurile de infecție de intensitate moderată până la severă, ceea ce a generat un impact socio-economic și de sănătate semnificativ asociat cu UCS. În lumina acestor informații, s-a susținut utilizarea terapiei care blochează mastocitele și mediatorii lor, atât în scop profilactic, cât și ca tratament simptomatic în timpul pandemiei de COVID-19 pentru pacienții vulnerabili, inclusiv cei cu UCS.

În studiul al doilea s-a evaluat nivelul IL-31 la 50 de pacienți cu UCS și corelațiile dinamicii sale cu severitatea bolii, cu intensitatea pruritului și cu răspunsul la tratament comparativ cu lotul martor format din 38 subiecți. În plus, s-a cuantificat modul în care nivelul de IL-31 are impact asupra calității vieții pacienților. Rezultatele obținute au demonstrat că există interacțiuni importante între nivelurile serice ale IL-31 și intensitatea pruritului, respectiv severitatea bolii (UAS7) și că această citokină are un impact semnificativ asupra calității vieții pacienților. Mai mult, corelația observată între nivelurile serice scăzute ale IL-31 și răspunsul pozitiv la antihistaminice H1 sugerează relevanța IL-31 ca posibil biomarker pentru prurit și ca țintă terapeutică potențială.

Studiul al treilea și-a propus să exploreze rolul critic al alarminelor în UCS, și mai ales să studieze impactul lor asupra gravității bolii și al calității vieții pacienților. În acest scop, s-au investigat modificările nivelurilor IL-25, IL-33, TSLP, la pacienții cu UCS și corelațiile acestora cu UAS7 și DLQI comparativ cu valorile obținute de la 38 de subiecți sănătoși. Rezultatele obținute au arătat o creștere a nivelului acestor alarmine respectiv a IL-33 și TSLP la pacienții cu UCS subliniind rolul lor potențial în patogeniza bolii. Corelația IL-33 cu scorurile UAS7 și cu DLQI subliniază potențialul său ca biomarker pentru diagnosticul și evaluarea gravității UCS dar și ca posibilă țintă în terapie.

Studiul patru s-a axat pe investigarea polimorfismului genetic al IL-33 (rs1929992) ca factor predictor pentru susceptibilitatea la UCS. Rezultatele obținute au indicat o incidență crescută a alelei minore a IL-33 în rândul pacienților cu UCS, sugerând că variațiile genetice pot influența susceptibilitatea la această afecțiune fără însă a se corela cu severitatea bolii și calitatea vieții pacienților.

CONCLUZII GENERALE

Cercetarea realizată în cadrul acestei teze a evidențiat clar complexitatea interacțiunilor imunologice și genetice asociate cu UCS.

Într-un context medical profund schimbat de pandemia SARS-CoV-2, UCS a fost, de asemenea, afectată semnificativ. Rezultatele acestei cercetări au subliniat impactul profund al pandemiei SARS-CoV-2 asupra manifestărilor clinice ale UCS, evidențiind rolul esențial al răspunsului inflamator sistemic și al mastocitelor în evoluția bolii. Interacțiunea dintre mastocite și agenții virali, mediată prin receptori de tip toll-like, și

succesul Omalizumabului în tratamentul selectiv al cazurilor de UCS exacerbate de COVID-19 deschid noi perspective terapeutice în abordarea acestei afecțiuni.

Studiile indică și un rol semnificativ al citokinelor, în special IL-31 și IL-33, în dezvoltarea simptomelor și în impactul lor asupra severității bolii și asupra calității vieții pacienților. Progresele în terapiile biologice, care vizează aceste citokine, reprezintă un nou capitol în managementul UCS, oferind speranțe pentru controlul pruritului și al erupțiilor cutanate și pentru îmbunătățirea calității vieții pacienților refractari la tratamentele standard.

Analiza polimorfismelor genetice a arătat că predispoziția genetică poate avea un rol crucial în susceptibilitatea la UCS, deși relația aceasta cu severitatea clinică și impactul asupra calității vieții rămâne de elucidat. Identificarea polimorfismelor genetice ale IL-33 ca factori contributivi constituie un progres important în înțelegerea mecanismelor patogenetice ale bolii.

Această teză adaugă noi perspective și validează abordări terapeutice inovatoare în literatura de specialitate, tratând o condiție complexă și multifactorială. Continuarea cercetărilor este esențială pentru avansarea în îngrijirea pacienților cu UCS, subliniind necesitatea unor strategii personalizate și ajustate la nevoile individuale ale fiecărui pacient.

DOCTORAL THESIS - ABSTRACT

The immunological signature and the role of the mast cell in chronic urticaria – implications for identifying new therapeutic targets

Doctoral student **Carmen-Teodora Dobrican**

PhD supervisor Prof.dr. **Gabriela Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
6. General framework	17
1.1. Definitions and classification	17
1.2. Epidemiology and prevalence	17
1.3. Natural evolution and prognosis	18
1.4. Impact on patients' quality of life	19
7. Etiology and pathogenesis	21
2.1. Histopathological characteristics of the skin	21
2.2. Autoimmunity theory	22
2.3. Mast cells in CSU	27
2.4. Cytokines	28
2.5. Genetic factors	32
8. Diagnostic	35
3.1. Patient history	35
3.2. Clinical diagnosis	36
3.3. Paraclinical diagnosis	36
3.4. Differential diagnosis	38
9. Assessment Tools/Clinical Scores and Scales	41
4.1. UAS and AAS	41
4.2. CTU	42
4.3. DLQI	42
10. Current treatments	
5.1. General principles and objectives	43
5.2. Pharmacological treatment	44
PERSONAL CONTRIBUTION	
5. Working hypothesis/objectives	49
6. General methodology	51
7. Study 1 - Exacerbation of Chronic Spontaneous Urticaria as a Consequence of the COVID-19 Disease: A Romanian Retrospective Study	53
3.1. Introduction	53
3.2. Working hypothesis/objectives	54
3.3. Material and method	54
3.4. Results	56
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusions	64

8. Study 2 - IL-31 – Interleukin of Pruritus – Serum Values and Clinical Impact in Chronic Spontaneous Urticaria - A Romanian Retrospective Study	65
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis/objectives	66
4.3. Material and method	67
4.4. Results	70
4.5. Discussions	79
4.6. Conclusions	83
9. Study 3 - The Alarmin Triad - IL-25, IL-33 and TSLP - Serum Levels and Their Clinical Implications in Chronic Spontaneous Urticaria	85
5.1. Introduction	85
5.2. Working hypothesis/objectives	85
5.3. Material and method	87
5.4. Result	90
5.5. Discussions	104
5.6. Conclusions	108
10. Study 4 - Exploring the impact of the genetic polymorphism of IL-33 (rs1929992) on susceptibility to Chronic Urticaria and its association with serum Interleukin-33	109
6.1. Introduction	109
6.2. Working hypothesis/objectives	111
6.3. Material and method	111
6.4. Result	115
6.5. Discussions	120
6.6. Conclusions	123
11. General discussions	125
12. General conclusions	127
13. The originality and innovative contributions of the thesis	129
REFERENCES	131

KEY WORDS: chronic urticaria, mast cells , cytokines, alarmins , pruritus, polymorphisms, therapeutic targets

INTRODUCTION

Chronic urticaria (CU) is a skin disease with a complex pathological and immunological mechanism, which is not fully understood. It is characterized by maculopapular, recurrent rashes, accompanied or not by angioedema, that persist for more than six weeks. This condition imposes a significant burden on patients, considerably affecting quality of life and generating substantial costs for health systems. The present work explores the immunological signature and the role of the mast cell in CU, with a special focus on chronic spontaneous urticaria (CSU) and attempts to identify new therapeutic targets by deciphering molecular mechanisms involved in pathogenesis.

CSU may have a multifactorial etiology, and in recent decades the theory of autoimmunity has gained ground, suggesting that autoantibodies directed against the FcεRI receptor or IgE may induce degranulation of the mast cells. This process is crucial in the development and maintenance of CSU symptoms. In addition, genetic factors may influence individual susceptibility to CSU as well as response to treatment, but these aspects are still not sufficiently explored.

The COVID-19 pandemic has added a new factor of complexity to this disease, with an increase in new cases of CSU and changes in symptomatology, especially with worsening, in pre-existing patients, possibly due to the viral impact on function of the immune system and the stress associated with the pandemic. This unexpected dynamic was integrated into the thesis research, providing an updated and relevant perspective on the association between viral infections and urticaria pathology.

This PhD thesis aims to expand the current understanding of the immunological and cellular mechanisms involved in UCS, specifically exploring the role and regulation of mast cells. Emphasis will be placed on the dynamics and role of cytokines involved in CU, to better understand how they contribute to the pathogenesis of CU and the maintenance of long-term symptoms. In this context, the implications of the COVID-19 pandemic on research in the field and how viral infections can activate mast cells was analysed. The thesis will try to define new therapeutic targets that can provide a more effective and personalized treatment for patients with CSU, thus contributing to the improvement of the management of this complex and debilitating condition.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the doctoral thesis includes information from the literature, presented in five chapters.

The first chapter of this part includes data on the current state of knowledge and the classification of chronic urticaria, continuing with data on epidemiology and prevalence, natural evolution and prognosis and the impact on quality of life. According

to the 2021 revised guideline of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), urticaria is a variable clinical entity with multiple subtypes, classified into acute and chronic urticaria, depending on the duration of symptoms, and spontaneous and inducible, depending on the triggering factors. CSU, which has no specific trigger, is the subject of discussion in this thesis.

The second chapter contains information on the etiology and pathogenesis of the disease, emphasizing the histopathological characteristics of urticaria, the theory of autoimmunity, the role played by the basophil, mast cells and cytokines, but also on the genetic factors involved. The mast cell is considered the central cell in the pathophysiological mechanisms of CU, with its activation triggered by various factors, including allergens, infections, and physical or chemical stress. The release of histamine and other inflammatory and vasoactive mediators by mast cells causes the typical symptoms of urticaria, such as rash, pruritus, and angioedema. Recently, it has been observed that cytokines such as Interleukin-31 (IL-31), IL-25, IL-33 and lymphopoietin thymic stromal cells (TSLP) may play a crucial role in the exacerbation and persistence of UC symptoms.

The third chapter deals with CSU diagnosis, namely clinical, paraclinical and differential diagnosis while chapter four includes data on assessment tools and clinical scale scores. Diagnosis is predominantly based on clinical examination and the patient's history, but in certain situations it can be supplemented by paraclinical tests such as challenge tests and serological determinations. Assessment of disease severity and impact on quality of life is performed using validated tools such as the Urticaria Activity Score (UAS) and the Dermatological Life Quality Index (DLQI).

Chapter five contains data on current treatments starting from general principles, from the administration of antihistamines to that of omalizumab and ciclosporin A, but also possible alternative therapies in this disease.

PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the thesis consists of four clinical studies, carried out during this doctoral research, retrospective and case control studies, including CSU patients and control subjects, with clinical, paraclinical and molecular evaluations.

In the first study, a main target was evaluating the impact of the COVID-19 pandemic on the dynamics and incidence of urticaria, but also on the behaviour of the mast cells in this condition. The results obtained showed that the COVID-19 pandemic added a new factor of complexity in this disease, observing an increase in new cases of urticaria and induced changes in symptomatology in pre-existing patients, possibly due to the impact of the viral infection on immune system function and pandemic stress. It was found that mast cells, key effector cells in the immune response in the case of CSU, can also play a role in the pathogenesis of COVID-19 and other post-infectious

inflammatory syndromes, by releasing pro-inflammatory mediators. Thus, the infection with COVID-19 can aggravate CSU symptoms, especially in cases of moderate to severe infection intensity, which has generated a significant socio-economic and health impact associated with CSU. Considering this information, the use of therapies that block mast cells and their mediators has been advocated, both prophylactically and as symptomatic treatment during the COVID-19 pandemic for vulnerable patients, including those with CSU.

In the second study, the level of IL-31 was evaluated in 50 patients with CSU and the correlations of its dynamics with the severity of the disease, with the intensity of pruritus and with the response to treatment compared to the control group consisting of 38 subjects. In addition, it was quantified how the level of IL-31 impacts the quality of life of the patients. The obtained results demonstrated that there are important interactions between the serum levels of IL-31 and the intensity of pruritus, respectively the severity of the disease (UAS7) and that this cytokine has a significant impact on the quality of life of patients. Furthermore, the observed correlation between low IL-31 serum levels and positive response to H1 antihistamines suggests the relevance of IL-31 as a possible biomarker for pruritus and as a potential therapeutic target.

The third study aimed to explore the critical role of alarmins in CSU, and especially to study their impact on disease severity and patients' quality of life. For this purpose, we investigated the changes in IL-25, IL-33, TSLP levels in CSU patients and their correlations with UAS7 and DLQI compared to the values obtained from 38 healthy subjects. The obtained results showed an increase in the level of these alarmins respectively IL-33 and TSLP in CSU patients underlining their potential role in the pathogenesis of the disease. The correlation of IL-33 with UAS7 scores and with DLQI underlines its potential as a biomarker for the diagnosis and assessment of CSU severity but also as a possible target in therapy.

Study four focused on the investigation of the genetic polymorphism of IL-33 (rs1929992) as a predictive factor for susceptibility to CSU. The obtained results indicated an increased incidence of the minor allele of IL-33 among patients with CSU, suggesting that genetic variations may influence the susceptibility to this condition, however, without correlating with the severity of the disease and the quality of life of the patients.

GENERAL CONCLUSIONS

The research carried out in this thesis clearly highlighted the complexity of the immunological and genetic interactions associated with CSU.

In a medical context profoundly changed by the SARS-CoV-2 pandemic, CSU has also been significantly affected. The results of this research highlighted the profound impact of the SARS-CoV-2 pandemic on the clinical manifestations of UCS, emphasizing the essential role of the systemic inflammatory response and mast cells in the evolution of the disease. The interaction between mast cells and viral agents, mediated by toll-like

receptors, and the success of Omalizumab in the selective treatment of CSU cases exacerbated by COVID-19 open new therapeutic perspectives in addressing this condition.

Studies also indicate a significant role of cytokines, especially IL-31 and IL-33, in the development of symptoms and their impact on disease severity and patients' quality of life. Advances in biologic therapies targeting these cytokines represent a new chapter in the management of CSU, offering hope for controlling pruritus and rashes and improving quality of life in patients refractory to standard treatments.

Analysis of genetic polymorphisms has shown that genetic predisposition may play a crucial role in CSU susceptibility, although its relationship with clinical severity and impact on quality of life remains to be elucidated. The identification of IL-33 genetic polymorphisms as contributing factors constitutes an important advance in understanding the pathogenetic mechanisms of the disease.

This thesis adds new insights and validates innovative therapeutic approaches in the literature, treating a complex and multifactorial condition. Continued research is essential for advancing the care of patients with CSU, emphasizing the need for strategies that are personalized and adjusted to the individual needs of each patient.