

DOCTORAL SCHOOL

Ph.D. THESIS SUMMARY

The innate immune memory underlying chronic inflammation

Ph.D. Student **Georgiana Cabău**

Ph.D. Coordinator Prof. Dr. **Leonardus A.B. Joosten**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. The innate immune memory	17
1.1. The innate immune response	17
1.2. Induction and maintenance of innate immune memory	19
1.2.1. Epigenetic reprogramming	19
1.2.2. Metabolic reprogramming	20
1.3. Consequences of innate immune memory: beneficial and maladaptive outcomes	21
2. Urate - induced innate immune memory	23
2.1. Urate in health and disease	23
2.1.1. Urate physiology	23
2.1.2. Asymptomatic hyperuricemia and gout	24
2.2. Urate as a damage-associated molecular pattern	25
2.2.1. MSU crystal - dependent inflammation	25
2.2.2. Soluble urate - dependent inflammation	27
2.3. Mechanisms of urate - induced immune programming	30
2.3.1. Epigenetic regulation	31
2.3.2. Metabolic regulation	32
2.4. Gout as a model of maladaptive innate immune programming	33
3. Leveraging innate immune memory in vaccination	37
3.1. Role of adjuvants in vaccination	37
3.2. Urate as an adjuvant: beneficial vs. maladaptive effects	38
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Research hypothesis and objectives	43
2. General methodology	43

3. Study 1 – Serum proteomics: in vivo evidence for urate-induced inflammation in gout and hyperuricemia	47
3.1. Introduction	47
3.2. Research hypothesis and objectives	48
3.3. Materials and methods	48
3.4. Results	51
3.5. Discussion	61
3.6. Conclusions	65
4. Study 2 – Functional validation of TGF-beta in urate-induced inflammation	67
4.1. Introduction	67
4.2. Research hypothesis and objectives	68
4.3. Materials and methods	68
4.4. Results	71
4.5. Discussion	79
4.6. Conclusions	81
5. Study 3 – De novo fatty acid synthesis: immunometabolic basis of urate-induced innate immune memory	83
5.1. Introduction	83
5.2. Research hypothesis and objectives	84
5.3. Materials and methods	84
5.4. Results	85
5.5. Discussion	90
5.6. Conclusions	90
6. Study 4 – Urate and innate immune responses in BNT162b2 mRNA vaccination against COVID-19	91
6.1. Introduction	91
6.2. Research hypothesis and objectives	92
6.3. Materials and methods	92
6.4. Results	94
6.5. Discussion	100
6.6. Conclusions	103
7. General discussion	105
8. General conclusions	109
9. Novelty and innovation	111
REFERENCES	113
ANNEXES	130

Keywords: innate immune memory, soluble urate, hyperuricemia, gout, chronic inflammation, serum proteomics, immunometabolism, vaccination;

INTRODUCTION

The present thesis investigates the role of uric acid in inducing maladaptive innate immune memory and promoting chronic inflammation.

Physiologically, urate functions as a potent antioxidant, yet elevated serum urate levels, or hyperuricemia, are linked to various cardiometabolic and inflammatory disorders, increased mortality, cancer, and accelerated aging, creating a significant health burden. *In vitro* research indicates that urate can induce a pro-inflammatory phenotype in myeloid cells, reminiscent of innate immune memory or trained immunity, which involves epigenetic and metabolic reprogramming. This maladaptive innate immune memory can perpetuate chronic inflammation in conditions such as gout and asymptomatic hyperuricemia.

The thesis aims to elucidate the mechanisms by which urate induces maladaptive innate immune memory and chronic inflammation through four specific objectives: providing *in vivo* evidence of urate-induced inflammation using serum proteomics, validating signaling pathways related to urate-induced inflammation, exploring metabolic reprogramming of inflammatory priming, and examining urate's role in vaccine-induced innate immune responses.

The significance of this research lies in its potential to transform our understanding of hyperuricemia from a metabolic bystander to a causal trigger of persistent inflammation.

The thesis is divided into two main sections: the "Current State of Knowledge," which outlines foundational concepts of innate immune memory and urate physiology, and "Personal Contribution," which details the methodologies, findings, and clinical implications of four key studies on urate-induced inflammation. Ultimately, this work bridges several research gaps, uncovering therapeutic targets and strategies for managing conditions associated with urate, while offering insights into non-specific immune responses related to mRNA vaccination.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The "Current State of Knowledge" section of the thesis explores the foundational concepts of innate immune memory, its mechanisms, and the role of urate in modulating this memory. Innate immune memory, or trained immunity, is characterized by long-lasting functional reprogramming of innate immune cells following an initial insult, enhancing their response to subsequent challenges. This reprogramming involves epigenetic modifications, such as changes in histone methylation and acetylation, and metabolic adaptations that alter cellular energy pathways. These changes lead to a heightened state of readiness in innate immune cells, allowing them to respond more robustly to pathogens.

The section further details the physiological role of urate, an end product of purine metabolism, which acts as a potent antioxidant at normal levels, protecting cells from oxidative damage. However, elevated serum urate levels, or hyperuricemia, are associated with a range of health issues, including gout, cardiometabolic and inflammatory disorders, increased mortality, cancer, and accelerated aging. Urate, by acting as a damage-associated molecular pattern (DAMP) is capable of activating the innate immune system through pathways such as the NLRP3 inflammasome, which leads to the release of pro-inflammatory cytokines like IL-1 β and downregulation of IL-1Ra, the main IL-1 β antagonist.

This section revisits existing evidence for urate-induced inflammation, detailing its role as a DAMP, the inflammatory pathways it activates, and the mechanisms by which it induces innate immune memory, including epigenetic and metabolic changes. Additionally, the section discusses urate's function as an adjuvant in enhancing immune responses to vaccination, particularly in the context of mRNA-based vaccines, and the implications for both beneficial and maladaptive immune responses.

Overall, this section lays the groundwork for understanding the complex interactions between urate, innate immune memory, and chronic inflammation, unraveling the research gaps addressed by the four original key studies described in the "Personal Contribution" section.

PERSONAL CONTRIBUTION

In the "Personal Contribution" section, the thesis outlines the specific hypotheses, research objectives, and methodologies employed to investigate the role of urate in inducing maladaptive innate immune memory and chronic

inflammation. This section provides a detailed account of the experimental approaches and findings that contribute to the understanding of urate's impact on the immune system.

The main objectives of the four key studies are: 1) To bridge the gap in knowledge regarding the scarcity of *in vivo* evidence for urate induced inflammation and innate immune memory; 2) To further validate the role of TGF- β signaling in urate relevant inflammation; 3) To elucidate the metabolic rewiring underpinning the lasting inflammatory phenotype induced by urate and, 4) to investigate non-specific responses following mRNA vaccination and the impact of urate on innate immune responses in vaccination.

By elucidating these mechanisms, the thesis aimed to describe potential targets for therapeutic intervention in diseases characterized by urate-induced inflammation.

Study 1 – Serum proteomics: *in vivo* evidence for urate-induced inflammation in gout and hyperuricemia

Introduction: The role of uric acid is complex and debated, with some showing it to be protective and antioxidant, while others view it as pro-oxidant and pro-inflammatory. Gout and monosodium urate crystals are known to trigger inflammation by activating the NLRP3 inflammasome, but the effects of soluble urate and asymptomatic hyperuricemia (AH) remain underexplored. AH, marked by high serum urate levels in the absence of gout and, although linked to a broad range of cardiometabolic comorbidities, its direct inflammatory role is debated. *In vitro* research shows that soluble urate can imprint a pro-inflammatory phenotype in myeloid cells leading to enhanced pro-inflammatory cytokine production and decreased IL-1Ra, which exacerbates inflammation. Despite *in vitro* findings, *in vivo* evidence of AH's inflammatory impact is limited, with some epidemiological studies showing associations with cardiometabolic disorders and inflammatory markers.

Research hypothesis and objectives: AH induces a pro-inflammatory state in the body which can initiate systemic inflammation before and, regardless of the presence of clinical gout symptoms. We aimed to 1) characterize and compare the inflammatory proteomic signatures of gout and asymptomatic hyperuricemia; 2) functionally characterize the identified FGF-21 biomarker in relation to cytokine production, and 3) monitor alterations in the proteomic profile of patients with gout following urate-lowering therapy.

Materials and methods: The study included 193 gout patients, 154 with asymptomatic hyperuricemia, and 215 normouricemic controls from various clinics in Cluj-Napoca, Romania from which we collected blood samples and clinical data. Another independent group of 25 gout patients undergoing allopurinol therapy was recruited following a longitudinal study design. We employed a serum proteomics approach conducted using the Olink® Target 96 inflammation panel to quantify 73 proteins linked to inflammatory processes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples and used to test the effect of rhFGF-21 on C16 and Monosodium urate (MSU) crystals induced inflammation. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism and R software for data processing and significance testing

Results and discussion: We have found that the serum proteome of asymptomatic hyperuricemia is marked by a high inflammatory state, demonstrating a urate-driven signature in both AH and gout. We show a marked inflammatory signature in samples of individuals with AH compared to NU controls. No differentially expressed proteins were observed in samples of patients with gout versus all controls, which included asymptomatic hyperuricemia and normouricemic individuals. This could be explained by a urate-dependent effect which drives inflammation both in asymptomatic hyperuricemia as well as in gout.

One of the markers that was elevated in hyperuricemic individuals was FGF21. Due to the observation that this was also the most upregulated protein in hyperuricemic patients with gout compared to NU gout, we further assessed the functional consequences of rhFGF-21 addition *in vitro* stimulation experiments using primary human PBMCs. Our study indicates that rhFGF-21 dampened cytokine production and we hypothesize that FGF-21 may play a role in limiting gouty inflammation by decreasing the inflammatory response of the gout-specific stimulus, C16.0 and MSU.

Additionally we described targetable biomarkers in chronic tophaceous gout. Among these, RANKL/TRAIL hold significant promise for the treatment of bone destruction, as there are already multiple compounds targeting these pathways undergoing clinical trials for the treatment of cancer associated bone fractures and osteoporosis.

Lastly, to assess whether serum urate reduction would have the potential to reverse the elevated levels of inflammatory biomarkers presented here, we investigated the effect of urate-lowering therapy (ULT) on the inflammatory status of patients with gout. No change of the inflammatory proteome has been observed after 1 month of ULT, despite a slight reduction in serum urate levels already present at this time. After three months of ULT, in patients who reached the target urate level of 6 mg/dL, eight inflammatory markers were significantly decreased, and seven others showed a nominally significant reduction. This shows that, indeed, interventions aimed at reducing urate concentrations do, in the long-term, also reduce inflammatory profile of the patients. We show that both a reduction in sUA concentration and a longer duration of treatment plays a role in reversing the inflammatory status of patients with gout.

This confirms our hypothesis that hyperuricemia alone is sufficient to drive systemic inflammation, validating the *in vitro* effects and potentially priming the immune system for chronic inflammation. We showed that urate

lowering therapy (ULT) using allopurinol only partially reversed the urate imprinted inflammatory signature even after months of sUA normalization. This finding brings *in vivo* evidence for the persistence of innate immune memory associated with urate and highlights the need for therapeutic intervention of asymptomatic hyperuricemia and for the prevention of life-reducing cardiometabolic complications it associates.

Study 2. Functional validation of TGF-beta in urate-induced inflammation

Introduction: Recent research highlights that soluble urate induces a pro-inflammatory state in monocytes, characterized by increased IL-1 β and reduced IL-1Ra. This inflammatory response is linked to changes in gene expression, particularly within the TGF- β signaling pathway. TGF- β , an anti-inflammatory cytokine with pro-fibrotic properties, is secreted in an inactive form and becomes active by dissociating from its latency-associated peptide. It then binds to TGF- β RII, forming a complex with TGF- β R1 that activates SMAD proteins, which regulate genes involved in inflammation and fibrosis. TGF- β 's role in myeloid cells can be complex: it generally suppresses inflammation in resting cells but can promote inflammation in activated cells by affecting signaling pathways like MyD88. TGF- β 's interaction with other signaling pathways, including TAK1, ERK, and PI3K-Akt, further complicates its role in urate-induced inflammation. Understanding TGF- β 's involvement in urate-induced inflammatory responses could offer new insights into managing gout and its associated comorbidities.

Research hypothesis and objectives: We hypothesize that urate induces a pro-inflammatory phenotype in human monocytes via TGF- β signaling pathways. This state is characterized by increased pro-inflammatory IL-1 β and decreased anti-inflammatory IL-1Ra, contributing to the pathogenesis of gout and hyperuricemia related inflammation. This study aims to 1) elucidate the role of TGF- β in the context of hyperuricemia and urate-induced reprogramming of myeloid cells and, by doing so, to 2) explore new potential therapeutic targets.

Materials and methods: Nine patients with gout and 7 healthy controls were used in the discovery cohort from Nijmegen, The Netherlands. Monocytes were isolated from blood and used for *in vitro* TGF- β 1 signalling experiments and uric acid priming experiments, as well as for *ex vivo* mRNA expression of TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, MMP9, ITGAV and SMAD7. *Ex vivo* PBMCs transcriptomics was performed in 110 individuals with normouricemia, 22 individuals with AH and 72 patients with gout from Cluj-Napoca, Romania. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism.

Results and discussion: In two different populations, TGF- β was elevated in subjects with hyperuricemia or gout and correlated to serum urate concentrations. *In vitro*, urate exposure did not directly induce TGF- β transcription or protein release in human monocytes but did induce C-terminally phosphorylated SMAD2. Moreover, urate-induced elevated IL-1 β production can be partly reversed by blocking TGF- β and several TGF- β receptor blockers ameliorate the urate-induced reduction of the monocyte IL-1Ra production.

We explored the expression levels of TGFB1, its two receptors TGFBR1 and TGFBR2 and three TGF- β target genes ITGAV, MMP9 and SMAD7, the latter being a negative regulator of TGF- β signalling. We observed either an increased expression of TGF- β itself in gout patients or an increase in TGF- β -LAP protein in hyperuricemic individuals. Also, the expression of the downstream targets ITGAV and MMP9 were increased in gout patients.

In our *in vitro* setting, we observed no change to TGFB1 expression, a decrease in TGFBR1 and SMAD7 expression, while MMP9 expression was again increased after treatment of PBMC with soluble urate for 24 h. Although both findings point towards enhanced TGF- β signalling pathway, prolonged exposure of PBMCs to elevated urate levels *in vivo* results to different TGF- β signalling kinetics compared to 24 h urate priming *in vitro*. By showing SMAD2 phosphorylation and blocking TGF- β *in vitro*, we were still able to demonstrate its relevance in urate-induced inflammatory phenotype.

Exploring the clinical relevance of urate induced changes in TGF- β signalling is not only important for gout but also for other rheumatic diseases as osteoarthritis and systemic sclerosis, where urate and TGF- β have been shown to play a role. Our findings support that ULT could help prevent the fibrotic complications associated with these diseases.

Study 3. *De novo* fatty acid synthesis: immunometabolic basis of urate-induced innate immune memory

Introduction: Immunometabolism studies how metabolism influences the function and immune responses of myeloid cells. Innate immune memory involves metabolic reprogramming that enhances subsequent responses to stimuli. Pro-inflammatory macrophages increase glycolysis, *de novo* fatty acid synthesis and disrupt the TCA cycle to support inflammation, while anti-inflammatory M2 macrophages rely on fatty acid oxidation for tissue repair. Soluble urate primes myeloid cells for higher induction of pro-inflammatory IL-1 β production via the Akt/mTOR pathway, a main regulator of metabolism. This can sustain inflammatory responses. This study examines metabolic changes in urate-exposed cells potentially identifying new therapeutic targets for preventing hyperuricemia-related inflammation and cardiometabolic complications.

Research hypothesis and objectives: This study hypothesizes that soluble urate exposure reprograms myeloid cell metabolism to sustain the urate-induced inflammatory phenotype. The present study aims to 1) elucidate

the metabolic shifts in urate-exposed myeloid cells, 2) determine the impact of glycolysis and fatty acid synthesis inhibition on urate-induced cytokine production, and to 3) identify potential metabolic targets for therapeutic intervention.

Materials and methods: Human monocytes were isolated from healthy volunteers and treated with glycolysis inhibitors, ACLY inhibitors, fatty acid synthesis inhibitors or medium controls for one hour before urate exposure for another 24h. After washing, cells were stimulated with LPS and MSU crystals for another 24h. IL-1 β , IL-1Ra, and IL-6 were measured in supernatants. Intracellular citrate levels were measured in monocytes from 5 healthy volunteers. *In vitro* PBMCs transcriptomics was used to analyse gene expression of metabolic genes after urate exposure. Statistical analysis was performed using GraphPad.

Results and discussion: Our results demonstrate that soluble urate exposure induces metabolic reprogramming in myeloid cells, promoting enhanced glycolysis and fatty acid synthesis. These metabolic adaptations contribute to the sustained pro-inflammatory phenotype observed in urate-exposed cells. The upregulation of glycolytic genes, including PFKFB3, PFKP, and PDHA1, suggests a shift towards increased glycolytic flux in response to urate stimulation. This metabolic shift is consistent with the metabolic reprogramming observed in classically activated M1 macrophages, which rely on glycolysis to meet their energetic and biosynthetic demands during inflammation.

The lipid metabolic genes ACC1 and FASN were also upregulated, while pharmacological inhibition of FAS restored the pro-inflammatory phenotype induced by urate, by lowering IL-1 β and restoring IL-1Ra production. These results demonstrate that the establishment of the pro-inflammatory phenotype in monocytes is dependent on *de novo* fatty acid synthesis. This observation not only provides a potential target for reversing the inflammatory phenotype, but also carries implications for cardiometabolic diseases such as endothelial dysfunction and atherosclerosis to which hyperuricemia is strongly associated.

19 Study 4. Urate and innate immune responses in BNT162b2 mRNA vaccination against COVID-

Introduction: The rapid development of COVID-19 vaccines, such as the mRNA-based BNT162b2 vaccine, has been effective in preventing severe disease by inducing immune responses against the SARS-CoV-2 spike protein. However, systemic inflammatory side effects have been reported, possibly linked to the lipid nanoparticles used in the vaccine. Epidemiological data suggest that the vaccine provides non-specific protection, reducing all-cause mortality, potentially through trained immunity, where innate immune cells undergo changes enhancing their response to future challenges. Similarly, uric acid by acting as a DAMP has been shown to prime innate immune cells, contributing to enhanced inflammatory responses and chronic inflammation through mechanisms like those seen in trained immunity. Previous studies have revealed that in mice, sUA peaks two days following BNT162b2 vaccination and is still elevated although at much lower levels by day 7. This measurement was based on the hypothesis that UA by acting as a DAMP can alter the innate immune responses and could potentially present an adjuvant role in BNT162b2 vaccination to enhance T cell responses and antibody production.

This study aims to examine long-term non-specific immune responses and cytokine production in response to unrelated pathogens after BNT162b2 vaccination, providing insights that could inform vaccine design and strategies to manage inflammatory conditions like hyperuricemia, which shares pathways involving uric acid-induced immune memory.

Research hypothesis and objectives: In the present study we aimed to explore long-term non-specific immune responses following mRNA vaccination with BNT162b2. Our goal was to address three key scientific questions: 1) whether the vaccine induces long-term systemic inflammation, for which we performed a targeted plasma inflammatory proteomic profiling; 2) to determine if BNT162b2 vaccination alters the innate immune response towards unrelated pathogens in experimental *in vitro* assays; 3) if plasma urate levels are associated with the vaccine induced innate immune response.

Materials and methods: The study included 20 healthy Romanian healthcare workers. Participants received the standard vaccination regimen (two initial doses and a booster), with blood collected at multiple time points: baseline, before the first dose, and 5-11 days after each dose, plus eight months after the booster. Uric acid, IgG antibody concentration against the S-protein and Olink 96 inflammatory proteomic analysis were determined in plasma at each timepoint. Freshly isolated PBMCs were stimulated for 24h with *C. albicans*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, LPS, *B. burgdorferi*, phytohemagglutinin or medium control. IL-6, IL-1 β , IL-1Ra and TNF were measured using ELISA. Statistical analysis was performed in GraphPad.

Results and discussion: No lasting systemic inflammation was observed post-vaccination. Plasma inflammatory markers showed no significant changes compared to pre-vaccination levels, even eight months after the booster dose. This aligns with previous studies indicating transient inflammation but no long-term increases in inflammatory markers, reinforcing the safety profile of the BNT162b2 vaccine.

Post-vaccination, PBMCs showed enhanced cytokine responses to bacterial and fungal stimuli, particularly after the booster dose. This response was sustained up to eight months, reminiscent of trained immunity. The enhanced

cytokine responses persisted for at least eight months for most stimuli, except for *Mycobacterium tuberculosis*, where responses waned.

In our study we did not find any significant increase in plasma UA concentrations at any of the investigated timepoints, therefore we did not explore the impact of urate on immune responses any further. This discrepancy between studies could be due to lack of power, different method of assessment and timepoint of investigation.

The data presented in this paper raises the discussion of whether the long-term broad effects of BNT162b2 vaccination correspond to a trained immunity-like process, in which the long-lasting HSPCs undergo epigenetic and metabolic reprogramming and give rise to monocytes exhibiting enhanced responsiveness. This emphasizes the vaccine's lasting impact and its potential for long-term non-specific protection against a broad range of pathogens, contributing to the understanding of the innate immune responses associated with mRNA vaccination.

GENERAL CONCLUSIONS

The research carried out during the present doctoral studies has significantly contributed to our understanding of the mechanisms underlying urate-induced inflammation. Through a comprehensive exploration employing serum proteomics, transcriptomics, immunological and metabolic pathway modulation, this research bridged several knowledge gaps and revealed the following key findings:

1. Brought in vivo evidence for urate induced innate immune memory
2. Revealed the role of hyperuricemia in initiating and perpetuating systemic inflammation
3. Identified new potential disease biomarkers and therapeutic targets in gout and hyperuricemia
4. Functionally validated the role of TGF-beta signaling in urate induced inflammation
5. Shed light on the underlying metabolic reprogramming of urate induced immune priming
6. Contributed to the understanding of innate immune responses in mRNA vaccination

This research underscores the need to manage hyperuricemia not only to prevent gout but also to mitigate related cardiometabolic issues. It also provides insights into the potential long-term effects and broader protective benefits of mRNA vaccines against various pathogens. The study lays the groundwork for future research on how urate levels, innate immunity, and chronic inflammation interact, aiming to enhance clinical outcomes and quality of life for affected individuals.

NOVELTY AND INNOVATION

This thesis significantly advances the understanding of gout and asymptomatic hyperuricemia, highlighting novel therapeutic strategies and research directions. A key finding is that asymptomatic hyperuricemia alone can initiate systemic inflammation, emphasizing the need for early intervention to prevent cardiometabolic disorders. Serum proteomics has identified potential biomarkers for stratifying patients and developing tailored treatments. Notably, FGF-21 has been shown to limit gouty inflammation, suggesting its therapeutic potential. Additionally, targeting RANKL and TRAIL may offer new treatments for chronic tophaceous gout.

The research also reveals that a urate-driven inflammatory signature can persist even after serum uric acid levels normalize, pointing to underlying epigenetic changes. This opens opportunities for exploring epigenetic modulation with existing drugs to reverse inflammatory changes in myeloid cells. TGF-beta, identified as a mediator of urate-induced inflammation, could also be a potential therapeutic target, particularly in fibrosing diseases like systemic sclerosis where urate plays a role.

Furthermore, the study on metabolic reprogramming and innate immune memory provides a foundation for investigating interactions between immunometabolism and urate-induced inflammation. This could lead to novel approaches for managing hyperuricemia-associated conditions.

Lastly, the research on the BNT162b2 mRNA vaccine demonstrates the longevity of non-specific immune responses, suggesting that mRNA vaccines might offer broader protection and could be particularly beneficial in resource-limited settings with high co-infection rates. The findings reinforce the safety and versatility of mRNA vaccine technology.

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Memoria imună înnăscută în inflamația cronică

Doctorand **Georgiana Cabău**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Leonardus A.B. Joosten**



CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Memoria imună înnăscută	17
1.1. Răspunsul imun înnăscut	17
1.2. Inducerea și menținerea memoriei imune înnăscute	19
1.2.1. Reprogramarea epigenetică	19
1.2.2. Reprogramarea metabolică	20
1.3. Consecințele memoriei imune înnăscute: efecte benefice și maladaptive	21
2. Memoria imună înnăscută indusă de urat	23
2.1. Uratul în fiziologie și patologie	23
2.1.1. Fiziologia uratului	23
2.1.2. Hiperuricemia asimptomatică și guta	24
2.2. Uratul ca model molecular asociat deteriorării	25
2.2.1. Inflamația dependentă de cristalele de MSU	25
2.2.2. Inflamația dependentă de uratul solubil	27
2.3. Mecanisme de programare imuna indusă de urat	30
2.3.1. Reglarea epigenetică	31
2.3.2. Reglarea metabolică	32
2.4. Guta ca model de programare maladaptativă a imunității înnăscute	33
3. Valorificarea memoriei imunitare înnăscute în vaccinare	37
3.1. Rolul adjuvanților în vaccinare	37
3.2. Uratul ca adjuvant: efecte benefice vs. maladaptive	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de cercetare și obiectivele	43
2. Metodologia generală	43

3. Studiul 1 – Proteomica serică: dovezi in vivo pentru inflamația indusă de urat în gută și hiperuricemie	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de cercetare și obiectivele	48
3.3. Materiale și metode	48
3.4. Rezultate	51
3.5. Discuție	61
3.6. Concluzii	65
4. Studiul 2 – Validarea funcțională a TGF-beta în inflamația indusă de urat	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de cercetare și obiectivele	68
4.3. Materiale și metode	68
4.4. Rezultate	71
4.5. Discuție	79
4.6. Concluzii	81
5. Studiul 3 – Sinteza <i>de novo</i> a acizilor grași: baza imunometabolică a memoriei imune înăscute indusă de urat	83
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de cercetare și obiectivele	84
5.3. Materiale și metode	84
5.4. Rezultate	85
5.5. Discuție	90
5.6. Concluzii	90
6. Studiul 4 – Uratul și răspunsurile imune înăscute în vaccinarea cu ARNm BNT162b2 împotriva COVID-19	91
6.1. Introducere	91
6.2. Ipoteza de cercetare și obiectivele	92
6.3. Materiale și metode	92
6.4. Rezultate	94
6.5. Discuție	100
6.6. Concluzii	103
7. Discuție generală	105
8. Concluzii generale	109
9. Originalitate și inovație	111
REFERINȚE	113
ANEXE	130

Cuvinte cheie: memorie imună înăscută, urat solubil, hiperuricemie, gută, inflamație cronică, proteomica serică, imunometabolism, vaccinare;

INTRODUCERE

Teza prezintă investighează rolul acidului uric în inducerea memoriei imune înnăscute maladaptative și în promovarea inflamației cronice. În mod fiziologic, uratul funcționează ca un antioxidant puternic, însă nivelurile serice crescute de acid uric, sau hiperuricemia, sunt asociate cu diverse tulburări cardiometabolice și inflamatorii, mortalitate crescută, cancer și îmbătrânire accelerată, creând o povară semnificativă pentru sănătate. Cercetările *in vitro* indică faptul că uratul poate induce un fenotip pro-inflamator în celulele mieloide, similar memoriei imune înnăscute sau imunității antrenate, care implică reprogramarea epigenetică și metabolică. Această memorie imuna înnăscută maladaptativă poate perpetua inflamația cronică în condiții precum guta și hiperuricemia asimptomatică.

Teza își propune să elucideze mecanismele prin care uratul induce memoria imuna înnăscută maladaptativă și inflamația cronică prin patru obiective specifice: furnizarea de dovezi *in vivo* ale inflamației induse de urat folosind proteomica serică, validarea căilor de semnalizare legate de inflamația indusă de urat, explorarea reprogramării metabolice a imprintării inflamatorii și examinarea rolului uratului în răspunsurile imune înnăscute induse de vaccin.

Semnificația acestei cercetări constă în potențialul său de a transforma înțelegerea noastră despre hiperuricemie dintr-un compus metabolic benign într-un factor cauzal al inflamației cronice.

Teza este împărțită în două secțiuni principale: „Stadiul Actual al Cunoașterii”, care conturează conceptele fundamentale ale memoriei imune înnăscute și fiziologiei uratului, și „Contribuția Personală”, care detaliază metodologiile, rezultatele și implicațiile clinice ale celor patru studii asupra inflamației induse de urat. În cele din urmă, această teză răspunde la mai multe întrebări științifice, descrie ținte terapeutice și strategii pentru gestionarea afecțiunilor asociate cu uratul, oferind în același timp perspective asupra răspunsurilor imune nespecifice legate de vaccinarea cu ARNm.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Secțiunea „Stadiul Actual al Cunoașterii” din teză explorează conceptele fundamentale ale memoriei imune înnăscute, mecanismele acesteia și rolul uratului în modularea acestei memorii. Memoria imună înnăscută, sau imunitatea antrenată, este caracterizată de reprogramarea funcțională de lungă durată a celulelor imunitare înnăscute în urma unei agresiuni inițiale, crescându-le răspunsul la stimulările ulterioare. Această reprogramare implică modificări epigenetice, cum ar fi metilarea și acetilarea diferențiată a histonelor, și reprogramarea metabolică care modifică căile energetice celulare. Aceste modificări duc la un nivel crescut de antrenare a celulele imunitare înnăscute, permițându-le să răspundă mai puternic la stimulii ulteriori.

Această secțiune detaliază în continuare rolul fiziologic al uratului, un produs final al metabolismului purinelor, care acționează ca un antioxidant puternic la niveluri normale, protejând celulele de stress-ul oxidativ. Cu toate acestea, nivelurile crescute de urat seric, sau hiperuricemia, sunt asociate cu o gamă de comorbidități, inclusiv guta, patologia cardiometabolică și inflamatorie, mortalitate crescută, cancer și îmbătrânire accelerată. Uratul, acționând ca un model molecular asociat cu deteriorarea (DAMP), este capabil să activeze sistemul imunitar înnăscut prin căi precum inflamozomul NLRP3, ceea ce duce la eliberarea de citokine pro-inflamatorii precum IL-1 β și la scăderea IL-1Ra, principalul antagonist al IL-1 β .

Această secțiune revizuieste dovezile existente pentru inflamația indusă de urat, detaliind rolul său ca DAMP, căile inflamatorii pe care le activează și mecanismele prin care induce memoria imuna înnăscută, inclusiv modificările epigenetice și metabolice. De asemenea, secțiunea discută funcția uratului ca adjuvant a răspunsurilor imune la vaccinare, în special în contextul vaccinurilor pe bază de ARNm.

Această secțiune stabilește baza pentru înțelegerea interacțiunilor complexe dintre urat, memoria imuna înnăscută și inflamația cronică, descriind lacunele de cercetare abordate de către cele patru studii originale descrise în secțiunea „Contribuția Personală”.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În secțiunea „Contribuția Personală,” teza descrie ipotezele specifice, obiectivele de cercetare și metodele utilizate pentru a investiga rolul uratului în inducerea memoriei imunitare înnăscute maladaptative și a inflamației cronice. Această secțiune oferă o prezentare detaliată a abordărilor experimentale și a rezultatelor care contribuie la înțelegerea impactului uratului asupra sistemului imunitar.

Obiectivele principale ale celor patru studii sunt: 1) Să aducă dovezi *in vivo* pentru inflamația și memoria imuna înăscută induse de urat; 2) Să valideze rolul semnalizării TGF-beta în inflamația indusă de urat; 3) Să elucideze reprogramarea metabolică care stă la baza fenotipului inflamator de durată indus de urat și, 4) Să investigheze răspunsurile nespecifice după vaccinarea cu ARNm și impactul uratului asupra acestora.

Prin elucidarea acestor mecanisme, teza are ca scop descrierea posibilelor ținte pentru intervenții terapeutice în bolile caracterizate de inflamație indusă de urat.

Studiul 1 – Proteomica serică: dovezi *in vivo* pentru inflamația indusă de urat în gută și hiperuricemie

Introducere: Rolul acidului uric este complex și dezbătut, unii considerându-l protector și antioxidant, în timp ce alții îl văd ca pro-oxidant și pro-inflamator. Guta și cristalele de urat monosodic sunt cunoscute pentru declanșarea inflamației prin activarea inflamozomului NLRP3, dar efectele uratului solubil și ale hiperuricemiei asimptomatice (HA) rămân insuficient explorate. HA, caracterizată prin niveluri ridicate de urat seric în absența gutei și, deși legată de o gamă largă de comorbidități cardiometabolice nu este tratată. Cercetările *in vitro* arată că uratul solubil poate imprima un fenotip pro-inflamator în celulele mieloide, ducând la creșterea producției de citokine pro-inflamatorii și la scăderea IL-1Ra, ceea ce exacerbează inflamația. În ciuda datelor *in vitro*, dovezile *in vivo* ale impactului inflamator al HA sunt limitate, unele studii epidemiologice arătând asocieri cu patologia cardiometabolică și markeri inflamatori.

Ipoteza și obiectivele cercetării: HA induce o stare pro-inflamatorie în organism, care poate iniția inflamația sistemică înainte și, indiferent de prezența simptomelor clinice ale gutei. Studiul are ca obiective 1) caracterizarea și compararea semnăturilor proteomice inflamatorii ale gutei și hiperuricemiei asimptomatice; 2) caracterizarea funcțională a biomarkerului FGF-21 identificat în raport cu producția de citokine și 3) monitorizarea modificărilor profilului proteomic al pacienților cu gută în urma terapiei de reducere a uratului utilizând allopurinol.

Materiale și metode: Studiul a inclus 193 de pacienți cu gută, 154 cu hiperuricemie asimptomatică și 215 controluri normouricemice din diverse clinici din Cluj-Napoca, România, de la care am colectat probe de sânge și date clinice. Un alt grup independent de 25 de pacienți cu gută care urmează terapie cu allopurinol a fost recrutat urmând un design de studiu longitudinal. Am utilizat o abordare de proteomică serică folosind panoul de inflamație Olink® Target 96 pentru a cuantifica 73 de proteine legate de procesele inflamatorii. Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMCs) au fost izolate din probele de sânge integral și folosite pentru a testa efectul rhFGF-21 asupra inflamației induse de cristalele C16 și urat monosodic (MSU). Analiza statistică a fost realizată folosind GraphPad Prism și software-ul R pentru procesarea datelor și testarea semnificației.

Rezultate și discuții: Am arătat că proteomul seric al hiperuricemiei asimptomatice este marcat de o stare inflamatorie ridicată, demonstrând o semnătură indusă de urat atât în HA cât și în gută. Am arătat o semnătură inflamatorie pronunțată în probele indivizilor cu HA comparativ cu controalele NU. Nu au fost observate proteine exprimate diferențiat în probele pacienților cu gută în comparația cu toate controalele, care au inclus hiperuricemie asimptomatică și indivizi normouricemici. Acest lucru ar putea fi explicat printr-un efect dependent de urat care conduce inflamația atât în hiperuricemia asimptomatică cât și în gută.

Unul dintre markerii care a fost crescut la indivizii hiperuricemici a fost FGF21. Datorită observației că aceasta a fost, de asemenea, cea mai crescută proteină la pacienții cu gută hiperuricemică comparativ cu gută normouricemică, am evaluat în continuare consecințele funcționale ale stimulării PBMCs *in vitro* cu rhFGF-21. rhFGF-21 a diminuat producția de citokine și ipotезăm că FGF-21 ar putea juca un rol în limitarea inflamației gutoase prin reducerea răspunsului inflamator al stimulului specific gutei, C16.0 și MSU.

În plus, am descris biomarkeri în guta tofacee cronică. Printre aceștia, RANKL/TRAIL prezintă o promisiune semnificativă pentru tratamentul distrucției osoase din gută, deoarece există deja multipli compuși care țintesc aceste căi în studii clinice pentru tratamentul fracturilor osoase asociate cancerului și osteoporozei.

În cele din urmă, pentru a evalua dacă reducerea uratului seric ar avea potențialul de a inversa nivelurile crescute de biomarkeri inflamatori prezenți, am investigat efectul terapiei de reducere a uratului (ULT) asupra stării inflamatorii a pacienților cu gută. Nu s-a observat nicio schimbare a proteomului inflamator după 1 lună de ULT, în ciuda unei ușoare reduceri a nivelurilor de urat seric deja prezente în acest moment. După trei luni de ULT, la pacienții care au atins nivelul țintă de urat de 6 mg/dL, opt markeri inflamatori au fost semnificativ reduși, iar alți șapte au arătat o reducere nominal semnificativă. Acest lucru arată că, într-adevăr, intervențiile menite să reducă concentrațiile de urat reduc, pe termen lung, și profilul inflamator al pacienților. Am demonstrat că este necesară atât o reducere a concentrației de SUA cât și o durată mai lungă a tratamentului în inversarea stării inflamatorii a pacienților cu gută.

Aceste rezultate confirmă ipoteza noastră că hiperuricemia este suficientă pentru a provoca inflamație sistemică, validând efectele descrise *in vitro*. Am arătat că terapia de reducere a uratului folosind allopurinol a inversat doar parțial semnătura inflamatorie imprimată de urat, chiar și după luni de normalizare a SUA. Această constatare aduce dovezi *in vivo* pentru persistența memoriei imune înăscute asociate cu urat și subliniază necesitatea intervenției terapeutice a hiperuricemiei asimptomatice și pentru prevenirea complicațiilor cardiometabolice le asociază.

Studiul 2. Validarea funcțională a TGF-beta în inflamația indusă de urat

Introducere: Cercetările recente evidențiază că uratul solubil induce o stare pro-inflamatorie în monocite, caracterizată prin creșterea IL-1 β și reducerea IL-1Ra. Acest răspuns inflamator este legat de modificări ale expresiei genelor, în special în cadrul căii de semnalizare TGF- β . TGF- β , o citokină anti-inflamatoare cu proprietăți pro-fibrotice, este secretată într-o formă inactivă și devine activă prin disocierea de peptidul său asociat latent. Ulterior, se leagă de TGF- β RII, formând un complex cu TGF- β RI care activează proteinele SMAD, care reglează genele implicate în inflamație și fibroză. Rolul TGF- β în celulele mieloide poate fi complex: în general, suprimă inflamația în celulele în repaus, dar poate promova inflamația în celulele activate prin afectarea căilor de semnalizare precum MyD88. Interacțiunea TGF- β cu alte căi de semnalizare, inclusiv TAK1, ERK și PI3K-Akt, complică și mai mult rolul său în inflamația indusă de urat. Înțelegerea implicării TGF- β în răspunsurile inflamatorii induse de urat ar putea oferi noi perspective în managementul gutei și a comorbidităților asociate.

Ipoteza și obiectivele cercetării: Ipotezăm că uratul induce un fenotip pro-inflamator în monocitele umane prin căile de semnalizare TGF- β . Această stare este caracterizată de IL-1 β pro-inflamator crescut și IL-1Ra anti-inflamator scăzut, contribuind la patogeneza gutei și a inflamației asociate hiperuricemiei. Acest studiu are ca scop 1) elucidarea rolului TGF- β în contextul hiperuricemiei și reprogramării induse de urat a celulelor mieloide și, prin aceasta, 2) explorarea de noi ținte terapeutice potențiale.

Materiale și metode: Nouă pacienți cu gută și 7 controale sănătoase au fost utilizați în cohorta de descoperire din Nijmegen, Olanda. Monocitele au fost izolate din sânge și utilizate pentru experimentele de semnalizare *in vitro* TGF- β 1 și pentru experimentele de priming cu acid uric, precum și pentru studii de expresie *ex vivo* a TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, MMP9, ITGAV și SMAD7. Transcriptomica PBMC *ex vivo* a fost efectuată pe 110 indivizi cu normouricemie, 22 de indivizi cu AH și 72 de pacienți cu gută din Cluj-Napoca, România. Analiza statistică a fost realizată în GraphPad Prism.

Rezultate și discuții: În două populații diferite, TGF- β a fost crescut la subiecții cu hiperuricemie sau gută și a fost corelat cu concentrațiile de urat seric. *In vitro*, expunerea la urat nu a indus direct transcripția TGF- β sau eliberarea de proteine în monocitele umane, dar a indus fosforilarea SMAD2 la C-terminal. Mai mult, producția crescută de IL-1 β indusă de urat poate fi parțial inversată prin blocarea TGF- β , iar blocanții receptorilor TGF- β ameliorează inflamația indusă de urat și crește IL-1Ra în monocite.

Am explorat nivelurile de expresie ale TGFB1, receptorii săi TGFBR1 și TGFBR2 și trei gene downstream de TGF- β , ITGAV, MMP9 și SMAD7, aceasta din urmă fiind un regulator negativ al semnalizării TGF- β . Am observat fie o creștere a expresiei TGF- β în sine la pacienții cu gută, fie o creștere a proteinei TGF- β -LAP la indivizii hiperuricemici. De asemenea, expresia țăintelor downstream ITGAV și MMP9 a fost crescută la pacienții cu gută.

În studiul nostru *in vitro*, nu am observat nicio schimbare în expresia TGFB1, am observat o scădere a expresiei TGFBR1 și SMAD7, în timp ce expresia MMP9 a fost din nou crescută după tratamentul PBMC cu urat solubil timp de 24 de ore. Prin fosforilarea SMAD2 și blocarea TGF- β *in vitro*, am arătat relevanța sa în fenotipul inflamator indus de urat.

Explorarea relevanței clinice a schimbărilor induse de urat în semnalizarea TGF- β nu este importantă doar pentru gută, ci și pentru alte boli reumatice precum osteoartrita și sclerodermia sistemică, unde uratul și TGF- β joacă un rol. Descoperirile noastre susțin că terapia de reducere a uratului ar putea ajuta la prevenirea complicațiilor fibrotice asociate acestor boli.

Studiul 3. Sinteza *de novo* a acizilor grași: baza imunometabolică a memoriei imune înăscute induse de urat

Introducere: Imunometabolismul studiază modul în care metabolismul influențează funcția și răspunsul imun al celulelor mieloide. Macrofagele pro-inflamatorii sunt caracterizate prin glicoliză crescută, sinteza *de novo* a acizilor grași și perturbarea ciclului acizilor tricarboxilici (TCA) pentru a susține inflamația. Macrofagele M2 anti-inflamatorii se bazează pe oxidarea acizilor grași și funcția bazală a TCA. Uratul solubil imprimă o memorie imună celulele mieloide pentru o inducție mai mare a producției de IL-1 β pro-inflamatorie prin calea Akt/mTOR, un mediator principal al metabolismului. Acest lucru poate susține răspunsurile inflamatorii. Studiul de față examinează modificările metabolice în celulele expuse la urat, identificând potențiale noi ținte terapeutice pentru prevenirea inflamației din hiperuricemie și a complicațiilor cardiometabolice ale acesteia.

Ipoteza și obiectivele cercetării: Acest studiu ipotezează că expunerea la uratul solubil reprogramă metabolismul celulelor mieloide pentru a susține fenotipul inflamator indus de urat. Studiul actual își propune să 1) elucideze modificările metabolice în celulele mieloide expuse la urat, 2) determine impactul inhibiției glicolizei și sintezei acizilor grași asupra producției de citokine induse de urat și 3) identifice posibile ținte metabolice pentru intervenții terapeutice.

Materiale și metode: Monocitele umane au fost izolate de la voluntari sănătoși și tratate cu inhibitori ai glicolizei, inhibitori ai ACLY, inhibitori ai sintezei acizilor grași sau mediu control timp de o oră înainte de expunerea

la urat pentru alte 24 de ore. După spălare, celulele au fost stimulate cu LPS și cristale de MSU pentru alte 24 de ore. IL-1 β , IL-1Ra și IL-6 au fost măsurate în supernatante. Nivelurile intracelulare de citrat au fost măsurate în monocitele de la 5 voluntari sănătoși. Transcriptomica PBMC *in vitro* a fost utilizată pentru a analiza expresia genelor metabolice după expunerea la urat. Analiza statistică a fost realizată folosind GraphPad.

Rezultate și discuții: Rezultatele noastre demonstrează că expunerea la urat solubil induce reprogramarea metabolică în celulele mieloide, promovând glicoliza crescută și sinteza acizilor grași. Aceste adaptări metabolice contribuie la fenotipul pro-inflamator persistent observat în celulele expuse la urat. Reglarea pozitivă a genelor glicolitice, inclusiv PFKFB3, PFKP și PDHA1, sugerează o schimbare către un flux glicolitic crescut ca răspuns la stimularea cu urat. Această schimbare metabolică este în concordanță cu reprogramarea metabolică observată la macrofagele M1 activate clasic, care se bazează pe glicoliză pentru a-și satisface cerințele energetice și biosintetice în timpul inflamației.

Genele metabolice lipidice ACC1 și FASN au fost, de asemenea, supraexprimate, în timp ce inhibarea farmacologică a FAS a restaurat fenotipul indus de urat, prin scăderea IL-1 β și restabilirea producției de IL-1Ra. Aceste rezultate demonstrează că stabilirea fenotipului pro-inflamator în monocite depinde de sinteza de novo a acizilor grași. Această observație nu doar că oferă o nouă țintă pentru restaurarea fenotipului imun normal mieloid, dar are și implicații pentru bolile cardiometabolice, cum ar fi disfuncția endotelială și ateroscleroza, cu care hiperuricemia este puternic asociată și unde modificările de sinteză a acizilor grași în monocitele circulante a fost descrisă.

Studiul 4. Uratul și răspunsurile imune înnăscute în vaccinarea cu BNT162b2 mRNA împotriva COVID-19

Introducere: Dezvoltarea rapidă a vaccinurilor împotriva COVID-19, cum ar fi vaccinul BNT162b2 bazat pe mRNA, a dus la prevenirea bolii severe prin inducerea răspunsurilor imune celulare și umorale împotriva proteinei spike a SARS-CoV-2. Totuși, au fost raportate efecte secundare inflamatorii sistemice, posibil legate de nanoparticulele lipidice utilizate în vaccin. Datele epidemiologice sugerează că vaccinul oferă protecție nespecifică, reducând mortalitatea de orice cauză, posibil prin fenomenul de imunitate antrenată, unde celulele imune înnăscute suferă modificări care îmbunătățesc răspunsul lor la provocări viitoare cu alți stimuli. În mod similar, acidul uric acționând ca un DAMP a fost demonstrat că pregătește celulele imune înnăscute, contribuind la răspunsuri inflamatorii crescute și inflamație cronică prin mecanisme similare cu cele observate în imunitatea antrenată. Studii anterioare au dezvăluit că la șoareci, uratul seric crește, atingând un vârf la două zile după vaccinarea cu BNT162b2 și rămâne crescut, deși la niveluri mult mai scăzute, până în ziua 7. Această studiu s-a bazat pe ipoteza că UA, acționând ca un DAMP, poate modifica răspunsurile imune înnăscute și ar putea prezenta un rol adjuvant în vaccinarea cu BNT162b2 pentru a îmbunătăți răspunsurile celulare T și producția de anticorpi.

Acest studiu își propune să examineze răspunsurile imune nespecifice pe termen lung și producția de citokine ca răspuns la agenți patogeni nespecifici după vaccinarea cu BNT162b2, oferind perspective care ar putea informa design-ul vaccinurilor și managementul condițiilor inflamatorii.

Ipoteza și obiectivele cercetării: În studiul prezent, ne-am propus să explorăm răspunsurile imune nespecifice pe termen lung după vaccinarea cu mRNA BNT162b2. Scopul nostru a fost să abordăm trei întrebări științifice cheie: 1) dacă vaccinul induce inflamație sistemică pe termen lung, pentru care am analizat un profil proteomic inflamator în plasmă; 2) să determinăm dacă vaccinarea cu BNT162b2 modifică răspunsul imun înnăscut la agenți patogeni nespecifici *in vitro*; 3) dacă nivelurile plasmatiche de urat sunt asociate cu răspunsul imun înnăscut indus de vaccin.

Materiale și metode: Studiul a inclus 20 de voluntari sănătoși. Participanții au primit regimul standard de vaccinare (două doze inițiale și un rapel), cu recoltare de sânge la mai multe momente de timp: bazal, înainte de prima doză, și la 5-11 zile după fiecare doză, plus opt luni după rapel. Acidul uric, concentrația de anticorpi IgG împotriva proteinei S și analiza proteomică inflamatorie Olink 96 au fost determinate în plasmă la fiecare moment de timp. PBMC-uri proaspăt izolate au fost stimulate timp de 24 de ore cu *C. albicans*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, LPS, *B. burgdorferi*, fitohemaglutinină sau control mediu. IL-6, IL-1 β , IL-1Ra și TNF au fost măsurate folosind ELISA. Analiza statistică a fost efectuată în GraphPad.

Rezultate și discuții: Nu a fost observată inflamație sistemică de lungă durată după vaccinare. Markerii inflamatori din plasmă nu au arătat schimbări semnificative comparativ cu nivelurile pre-vaccinare, chiar și la opt luni după doza de rapel. Acest lucru este în concordanță cu studiile anterioare care indică prezenta unei inflamații tranzitorii, dar fără creșteri pe termen lung ale markerilor inflamatori, consolidând profilul de siguranță al vaccinului BNT162b2.

Post-vaccinare, PBMC-urile au arătat răspunsuri crescute ale citokinelor la stimuli bacterieni și fungici, în special după doza de rapel. Acest răspuns a fost susținut până la opt luni, similar imunității antrenate. Răspunsurile crescute ale citokinelor au persistat timp de cel puțin opt luni pentru majoritatea stimulilor, cu excepția *Mycobacterium tuberculosis*, unde răspunsurile au început să scadă.

În studiul nostru nu am găsit nicio creștere semnificativă a concentrațiilor plasmatiche de UA la niciunul dintre momentele investigate, prin urmare nu am explorat impactul uratului asupra răspunsurilor imune mai departe.

Această discrepanță între studii ar putea fi datorată lipsei de putere, metodei diferite de evaluare și a momentului de investigare.

Datele prezentate în această lucrare ridică discuția dacă efectele pe termen lung ale vaccinării cu BNT162b2 corespund unui proces asemănător imunității antrenate, în care celulele stem hematopoietice de lungă durată prezintă o reprogramare epigenetică și metabolică și dau naștere la monocite care prezintă memorie imună înăscută. Acest lucru subliniază impactul de durată al vaccinului și potențialul său de protecție nespecifică pe termen lung împotriva unei game largi de agenți patogeni, contribuind la înțelegerea răspunsurilor imune înăscute asociate cu vaccinarea cu mRNA.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările realizate în cadrul studiilor doctorale au contribuit semnificativ la înțelegerea asupra mecanismelor care stau la baza inflamației induse de urat. Printr-o explorare cuprinzătoare care a folosit proteomica serică, transcriptomica, modularea căilor imunologice și metabolice, această cercetare a răspuns la mai multe întrebări științifice și a dezvăluit următoarele:

1. A adus dovezi *in vivo* pentru memoria imună înăscută indusă de urat.
2. A dezvăluit rolul hiperuricemiei în inițierea și perpetuarea inflamației sistemice.
3. A identificat noi biomarkeri potențiali ai bolii și ținte terapeutice în gută și hiperuricemie.
4. A validat funcțional rolul semnalizării TGF-beta în inflamația indusă de urat.
5. A elucidat reprogramarea metabolică care stă la baza memoriei imune înăscute induse de urat.
6. A contribuit la înțelegerea răspunsurilor imune înăscute în vaccinarea cu mRNA.

Această cercetare subliniază necesitatea de a trata hiperuricemia nu doar pentru a preveni guta, ci și pentru a preveni patologia cardiometabolică asociată. De asemenea, teza actuală oferă perspective asupra efectelor pe termen lung și beneficiilor protectoare nespecifice ale vaccinurilor mRNA împotriva diverselor agenți patogeni. Studiul pune bazele pentru cercetări viitoare asupra interacțiunilor dintre urat, imunitatea înăscută și inflamația cronică, cu scopul de a îmbunătăți calitatea vieții persoanelor afectate.

ORIGINALITATE ȘI INOVAȚIE

Această teză avansează semnificativ înțelegerea gutei și a hiperuricemiei asimptomatice, evidențiind strategii terapeutice și direcții de cercetare noi. O constatare cheie este că hiperuricemia asimptomatică poate iniția inflamația sistemică, subliniind necesitatea intervenției timpurii pentru a preveni tulburările cardiometabolice. Proteomica serică a identificat biomarkeri potențiali pentru stratificarea pacienților și dezvoltarea de tratamente personalizate. FGF-21 s-a dovedit că are rol în atenuarea inflamației din gută, prezentând un potențial terapeutic. În plus, țintirea RANKL și TRAIL ar putea oferi noi ținte de tratament pentru guta cronică tofacee.

De asemenea, semnătura inflamatorie determinată de urat poate persista chiar și după normalizarea nivelurilor de acid uric seric, indicând schimbări epigenetice subiacente. Acest lucru deschide oportunități pentru explorarea modulării epigenetice cu medicamente existente pentru a restaura schimbările inflamatorii induse de urat în celulele mieloide. TGF-beta, identificat ca mediator al inflamației induse de urat, ar putea fi, de asemenea, o potențială țintă terapeutică, în special în bolile fibrozante precum sclerodermia sistemică, unde uratul joacă un rol.

Studiul asupra reprogramării metabolice subiacente memoriei imune înăscute oferă o bază pentru investigarea interacțiunilor dintre imunometabolism și inflamația indusă de urat. Acest lucru ar putea duce la abordări noi pentru gestionarea condițiilor asociate cu hiperuricemia.

În cele din urmă, cercetarea privind vaccinul BNT162b2 mRNA demonstrează longevitatea răspunsurilor imune nespecifice, sugerând că vaccinurile mRNA ar putea oferi o protecție mai nespecifică și ar putea fi benefice în special în medii cu resurse limitate și rate mari de coinfecție. Rezultatele întăresc profilul de siguranță și versatilitatea tehnologiei vaccinurilor mRNA.