

lek. Natalia Przysucha

Ocena aktywności i stężenia chitynaz w różnych materiałach biologicznych u pacjentów z wybranymi chorobami układu oddechowego

Promotor: prof. dr hab. Rafał Krenke

Streszczenie w języku polskim

Ludzkie chitynazy należą do rodziny glikozylohydrolaz, których zadaniem jest rozkład biopolimeru chityny. W przeszłości stanowiły istotny element wrodzonej odporności (m.in. przeciwko chitynowym pancerzom pasożytów), obecnie ich znaczenie upatruje się w złożonych mechanizmach odpornościowych wrodzonych i nabytych. Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są: chitotriozydaza (CHIT1) oraz kwaśna chitynaza ssacza (AMCase). Oprócz aktywnych enzymatycznie chitynaz, wiele organizmów wytwarza również białka chitynazopodobne, pozbawione zdolności hydrolizy chityny, lecz pełniące istotne funkcje regulacyjne w odpowiedzi komórkowej i tkankowej. Z klinicznego punktu widzenia najistotniejszym przedstawicielem tej drugiej grupy jest białko podobne do chitynazy-3 typu 1 (CHI3L1), znane również jako YKL-40.

Niniejsza rozprawa doktorska obejmuje cykl trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach: jednej pracy pogładowej oraz dwóch pracach oryginalnych. Wstęp do rozprawy doktorskiej oparty jest na pracy pogładowej pt. *Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications*, w której przeprowadzono szeroką analizę dostępnego piśmiennictwa podsumowując dotychczasową wiedzę o potencjalnej roli chitynaz w chorobach obturacyjnych układu oddechowego (przede wszystkim astmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc- POChP), uwzględniając zarówno dane in vitro, dane z modeli zwierzęcych i badań z udziałem ludzi. Omówiono mechanizmy związane z rolą tych mediatorów w zapaleniu, remodelingu i destrukcji mięszu płucnego. Usystematyzowano dotychczasową (na rok 2020) wiedzę dotyczącą potencjalnych stymulatorów, typów komórek produkujących chitynazy i szlaków sygnałowych. Uwzględniono badania

pokazujące efekt nadmiernej stymulacji chitynaz, jak i sytuacji ich zmniejszonej lub całkowitego braku aktywności (np. w wyniku mutacji genetycznych). Dodatkowo przeanalizowano rolę wybranych czynników, mogących mieć wpływ na aktywność chitynaz (m.in. wiek, płeć, steroidoterapię) i zasugerowano dalsze możliwe kierunki badań nad tymi białkami.

W kolejnej pracy przeprowadzonej w ramach przewodu doktorskiego, tj. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure* zbadano rolę chitynaz w rozwoju przewlekłego zapalenia w drogach oddechowych w odpowiedzi na ekspozycję na dym tytoniowy. Publikacja o powyższym tytule przedstawia obserwacyjne badanie kliniczne przeprowadzone w latach 2018–2019. Do badania włączono 43 osoby powyżej 40. roku życia, w tym 22 pacjentów z łagodną i umiarkowaną postacią POChP, 12 palaczy bez chorób układu oddechowego oraz 9 zdrowych osób nigdy niepalących. Analizowano dostępną dokumentację medyczną (m.in. stopień nasilenia objawów chorobowych przy użyciu kwestionariusza mMRC i CAT, wyniki badań czynnościowych), skład komórkowy płwociny indukowanej oraz stężenia wybranych cytokin zapalnych, metaloproteinazy MMP-9, a także chitynaz (YKL-40, CHIT1) metodą ilościowego testu ELISA. Dodatkowo przeprowadzono ocenę aktywności chitynolitycznej CHIT1. Stwierdzono, że stężenie YKL-40 było istotnie wyższe u pacjentów z POChP w porównaniu do pozostałych grup. Co więcej, wykorzystanie modelu regresji logistycznej pozwoliło wskazać, że zwiększone stężenie YKL-40 w indukowanej płwocinie stanowi czynnik ryzyka rozwoju POChP. Dodatkowo wykazano pozytywną korelację między stężeniem i aktywnością CHIT1 oraz stężeniem YKL-40 a stężeniem prozapalnych cytokin- Il-8 oraz MMP-9. Szczegółowa analiza klastrów grup badanych wykazała dodatkowo, że pacjenci z POChP nie są jednorodną grupą. Wyodrębniono dwa podstawowe klastry. Tylko część pacjentów z POChP (zwana klastrem 2) charakteryzowała się bardziej nasilonym stanem zapalnym dróg oddechowych, odzwierciedlonym przez wyższą liczbę komórek zapalnych w płwocinie, wyższymi stężeniami cytokin oraz większą aktywnością i podwyższonymi stężeniami CHIT1 i YKL-40 w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do klastra 1 (obejmującego pozostałych uczestników badania).

Ostatnia praca z cyklu publikacji pt: *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* dotyczyła stężeń i aktywności chitynolitycznej w płynach z opłucnej wywołanych różnymi schorzeniami oraz ekspresji chitynaz w biopłatach z opłucnej. Przedstawiona praca miała charakter retrospektywnego badania i obejmowała 66 dorosłych pacjentów z wysiękiem opłucnowym, u których wykonywano torakocentezę w Katedrze i Klinice

Chorób Wewnętrznych, Peumonologii i Alergologii WUM w latach 2020- 2023. U wszystkich pacjentów oprócz diagnostycznej torakocentezy, przeprowadzono kompleksową analizę płynu opłucnowego, obejmującą ocenę parametrów biochemicznych, cytologicznych, mikrobiologicznych i aktywności deaminazy adenozy (ADA), zgodnie z obowiązującymi standardami. Stężenia YKL-40 i CHIT1 w płynie opłucnowym oznaczano metodą ilościowego testu ELISA o wysokiej czułości, a w wybranych przypadkach gruźlicy opłucnej dodatkowo oceniano ich ekspresję w ziarniniakach gruźliczych za pomocą barwień immunohistochemicznych. Najwyższe stężenia CHIT1 oraz YKL-40 odnotowano w płynach o etiologii gruźliczej. Dodatkowo wykryto pozytywną korelację między stężeniem YKL-40 a odsetkiem makrofagów oraz aktywnością deaminazy adenozy (ADA). Oceniono również wartość diagnostyczną stężenia YKL-40 w płynie opłucnowym (czułość 78,85% oraz swoistość 85,7% przy wartości odcięcia wynoszącej 500 ng/mL). Analiza materiału histopatologicznego z biopsji opłucnej wykazała wyraźny, jednoznacznie wykrywalny sygnał YKL-40 w cytoplazmie komórek nabłonkowych oraz komórek wielojądrzastych. Natomiast barwienie CHIT1 było pomijalne. Uznano, że analiza wzorca ekspresji chitynaz w materiałach histopatologicznych może stanowić wartościowy biomarker w diagnostyce różnicowej chorób ziarniniakowych.