

lek. Natalia Przysucha

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

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o
zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Rafał Krenke

Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk
Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2026 r.

Słowa kluczowe: chitynazy, chitotriozydaza, CHIT1, YKL-40, astma, POChP, płyn w opłucnej, wysięk gruźliczy, palenie tytoniu.

Keywords: chitinases, chitotriosidase, CHIT1, YKL-40, asthma, COPD, pleural effusion, tuberculous pleurisy, smoking.

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi, Panu Profesorowi Rafałowi Krenke za cierpliwość, życzliwość oraz
nieocenione wsparcie merytoryczne.*

*Pani Profesor Katarzynie Górskiej dziękuję za merytoryczną pomoc oraz inspirację do
pracy naukowej.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję do dr hab. n. med. Magdaleny Paplińskiej-Gorycy za
cenne wskazówki metodologiczne.*

*Serdecznie dziękuję Pracownikom Ośrodka Diagnostyki Laboratoryjnej Chorób Układu
Oddechowego Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii UCK WUM
za pomoc w realizacji pracy doktorskiej.*

*Podziękowania kieruję również do pozostałych Pracowników Katedry i Kliniki Chorób
Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
za owocną współpracę naukową oraz okazywaną życzliwość.*

*Dziękuję Pracownikom Molecure S.A. za nieoceniony wkład w badania nad
chitynazami.*

*Wyrazy wdzięczności składam wszystkim Współautorom publikacji stanowiących
podstawę niniejszej rozprawy.*

*Szczególne podziękowania kieruję do Rodziny i Bliskich, w tym Rodziców i Rodzeństwa,
za wsparcie oraz niezachwianą wiarę we mnie.*

Mężowi dziękuję za cenne wskazówki edytorskie i wsparcie w trudnych momentach.

Dzieciom — za obecność i bliskość.

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:

1. **Przysucha N**, Górski K, Krenke R. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020 Apr 23;15:885-899. doi: 10.2147/COPD.S236640.

Praca poglądowa Punktacja MEiN: 100 Impact Factor: 3,1

2. **Przysucha N**, Górski K, Maskey-Warzęchowska M, Proboszcz M, Nejman-Gryz P, Paplińska-Goryca M, Dymek B, Zagozdzon A, Krenke R. The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure. *Cells*. 2022 Nov 25;11(23):3765. doi: 10.3390/cells11233765.

Praca oryginalna Punktacja MEiN: 140 Impact Factor: 5,2

3. **Przysucha N**, Paplińska-Goryca M, Górski K, Misiukiewicz-Stępień P, Młacki M, Cyran A, Krenke R. Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications. *Tuberculosis (Edinb)*. 2025 Dec;155:102692. doi: 10.1016/j.tube.2025.102692.

Praca oryginalna Punktacja MEiN: 100 Impact Factor: 2,9

Łączna punktacja MEiN: 340

Łączny IF: 11,2

Spis treści:

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
2. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	9
3. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	12
4. WSTĘP	14
4.1. CHITYNAZY I BIAŁKA CHITYNAZOPODOBNE.....	14
4.1.1. Prawdziwe chitynazy	16
4.1.1.1. CHIT1	16
4.1.1.2. AMCase	18
4.1.2. Białka chitynazopodobne	18
4.2. ROLA CHITYNAZ W CHOROBYCH UKŁADU ODDECHOWEGO.....	19
4.2.1. Astma.....	20
4.2.2. POChP	21
4.2.3. Przewlekłe zapalenie indukowane ekspozycją na dym papierosowy 22	
4.2.4. Wyсіk gruźliczy.....	22
5. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	25
6. KOPIE OPUBLIKOWANYCH PRAC.....	26
7. PODSUMOWANIE I OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW	62
8. WNIOSKI.....	67
9. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ.	69
10. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI.....	71
11. PIŚMIENNICTWO DO ROZDZIAŁÓW W JĘZYKU POLSKIM..	83

1. Wykaz stosowanych skrótów

Skrót	Pełna nazwa w języku angielskim	Pełna nazwa w języku polskim
ADA	Adenosine Deaminase	Aktywność deaminazy adenozyiny
AMCase	Acidic Mammalian Chitinase	Kwaśna chitynaza ssacza
BALF	Bronchoalveolar Lavage Fluid	Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego
BMI	Body Mass Index	Wskaźnik masy ciała
CAT	COPD Assessment Test	Kwestionariusz CAT
CLPs	Chitinase-Like Proteins	Białka chitynazopodobne
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Przewlekła obturacyjna choroba płuc
POChP	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Przewlekła obturacyjna choroba płuc
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Test ELISA
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	Kinaza serynowo-treoninowa z rodziny MAPK
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 Second	Natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
FVC	Forced Vital Capacity	Natężona pojemność życiowa
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease	Światowa Inicjatywa Zwalczania POChP
IFN- γ	Interferon gamma	Interferon γ
IL	Interleukin	Interleukina
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacharyd

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Kinaza aktywowana mitogenami
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	Białko chemotaktyczne dla monocytów 1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha	Białko zapalne makrofagów 1 α
mMRC	Modified Medical Research Council Dyspnea Scale	Skala nasilenia duszności mMRC
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9	Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9
NF- κ B	Nuclear Factor kappa beta	Czynnik jądrowy κ B
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2	Białko zawierające domenę oligomeryzacji wiążącą nukleotyd 2
SI-CLP	Stabilin-1-Interacting Chitinase-Like Protein	Białko podobne do chitynazy wchodzące w interakcję ze stabiliną-1
TGF- β	Transforming Growth Factor beta	Transformujący czynnik wzrostu β
Th2	T Helper Type 2 Cells	Limfocyty T pomocnicze typu 2
TLR	Toll-Like Receptor	Receptor Toll-podobny
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha	Czynnik martwicy nowotworów α
Treg	Regulatory T Cells	Limfocyty T regulatorowe
WHO	World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia
w.nal.	Predicted Values	Wartości należne
YKL-39	Chitinase-3-Like Protein 2	Białko podobne do chitynazy 3 typu 2
YKL-40	Chitinase-3-Like Protein 1	Białko podobne do chitynazy-3 typu 1

Ym1	Chitinase-3-Like Protein (Mouse)	Mysie białko podobne do chitynazy 3
CHIT1	Chitotriosidase	chitotriozydaza

2. 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 miąższu 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 klastrowa 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 adenozyminy (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.

3. Streszczenie w języku angielskim

Human chitinases belong to the glycoside hydrolase family whose primary function is the degradation of the biopolymer chitin. Historically, these enzymes have been integral to innate immunity (e.g., against chitinous exoskeletons of parasites); nowadays, their significance is recognized within the complex network of both innate and adaptive immune mechanisms. The most prominent members of this enzymatic group are chitotriosidase (CHIT1) and acidic mammalian chitinase (AMCase). Beyond catalytically active chitinases, a wide range of organisms express chitinase-like proteins (CLPs) that, despite lacking chitinolytic activity, fulfill essential regulatory functions in the modulation of cellular and tissue responses. From a clinical perspective, the most relevant member of this second group is chitinase-3-like protein-1 (CHI3L1), also known as YKL-40.

The present doctoral dissertation is based on a series of three peer-reviewed publications, comprising one review article and two original research papers. The first article “Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases – current concepts and potential applications.” provides a comprehensive analysis of the literature up to 2020 was performed, summarizing the current understanding of the putative role of chitinases in obstructive respiratory diseases, principally asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The review synthesizes evidence derived from in vitro studies, animal models, and human investigations, delineating the molecular and cellular mechanisms through which these mediators contribute to inflammation, tissue remodeling, and parenchymal destruction. It systematizes knowledge on potential stimuli, chitinase-producing cell types, and signaling pathways, and discusses the consequences of both excessive chitinase activation and reduced or absent activity (e.g., due to genetic mutations). Moreover, the influence of selected modifiers such as age, sex, and steroid therapy on chitinase activity is examined, and future research directions are proposed.

The first original article entitled “The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure,” reports the findings of an observational clinical study assessing the involvement of chitinases in chronic airway inflammation triggered by tobacco smoke. This study, conducted between 2018 and 2019, enrolled 43 subjects aged >40 years: 22 patients with mild-to-moderate COPD, 12 smokers without respiratory disease, and 9 never-smokers. Clinical records (including

mMRC and CAT scores, pulmonary function tests) and induced sputum were analyzed for cellular composition, selected inflammatory cytokines, matrix metalloproteinase-9, and chitinases (YKL-40, CHIT1) using quantitative ELISA, together with assessment of CHIT1 chitinolytic activity. We found that YKL-40 concentrations were significantly higher in COPD patients compared with the other groups. Logistic regression identified elevated YKL-40 in induced sputum as an independent risk factor for COPD. Positive correlations were observed between CHIT1 concentration and activity, YKL-40 levels, and pro-inflammatory mediators (IL-8, MMP-9). Cluster analysis revealed heterogeneity within the COPD cohort, distinguishing two sub-clusters; only the second cluster exhibited a pronounced inflammatory phenotype characterized by higher inflammatory cell counts, cytokine levels, and increased chitinases concentrations and activity.

The second original article, entitled “Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications,” describes the study evaluating the concentrations, enzymatic activity, and tissue expression patterns of chitinases in pleural effusions of diverse etiologies. This retrospective study included 66 adult patients who underwent thoracentesis at the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw (2020-2023). Comprehensive pleural fluid analysis encompassed biochemical, cytological, microbiological parameters and adenosine deaminase (ADA) activity. YKL-40 and CHIT1 concentrations were measured by high-sensitivity ELISA; immunohistochemistry for these proteins was performed on selected tuberculous pleural biopsies. The highest CHIT1 and YKL-40 levels were observed in tuberculous effusions, with YKL-40 positively correlating with macrophage proportion and ADA activity. A diagnostic cut-off 500 ng mL for YKL-40 yielded 78.9 % sensitivity and 85.7 % specificity for tuberculous pleuritis. Immunohistochemistry demonstrated robust cytoplasmic YKL-40 staining in epithelial-like and multinucleated giant cells, whereas CHIT1 staining was negligible. The study concludes that the pattern of chitinase expression in pleural tissue may serve as a valuable biomarker for differential diagnosis of granulomatous diseases.

4. Wstęp

Źródłem zainteresowania potencjalną rolą chitynaz w chorobach układu oddechowego była współpraca zespołu Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii z pionem badawczo-rozwojowym firmy Molecure S.A (dawniej OncoArendi) w zakresie badań nad możliwością terapeutycznego wykorzystania inhibitorów tych enzymów. Udział w zespole badawczym pozwolił mi na zebranie odpowiednich grup pacjentów oraz przeprowadzenie badań nad ekspresją chitynaz w materiałach biologicznych pochodzących z układu oddechowego pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) oraz płynem w jamie opłucnej. Wstęp do części badawczej stanowił przegląd piśmiennictwa dotyczącego roli chitynaz w chorobach układu oddechowego. Ze względu na znacznie mniejszą ilość danych dotyczących roli tych enzymów w patogenezie i diagnostyce płynu w opłucnej, to zagadnienie nie było przedmiotem odpowiedniej pracy pogładowej, ale doczekało się omówienia w pracy oryginalnej. Tak więc podstawę niniejszej rozprawy stanowią publikacja pogładowa o roli i chitynaz w obturacyjnych chorobach i dwie publikacje oryginalne, w których przeprowadzono pomiary stężeń i aktywności chitynaz w płwocinie indukowanej chorych na POChP i płynie opłucnowym uzyskanym od chorych z różnymi schorzeniami stanowiącymi przyczynę płynu.

4.1. Chitynazy i białka chitynazopodobne

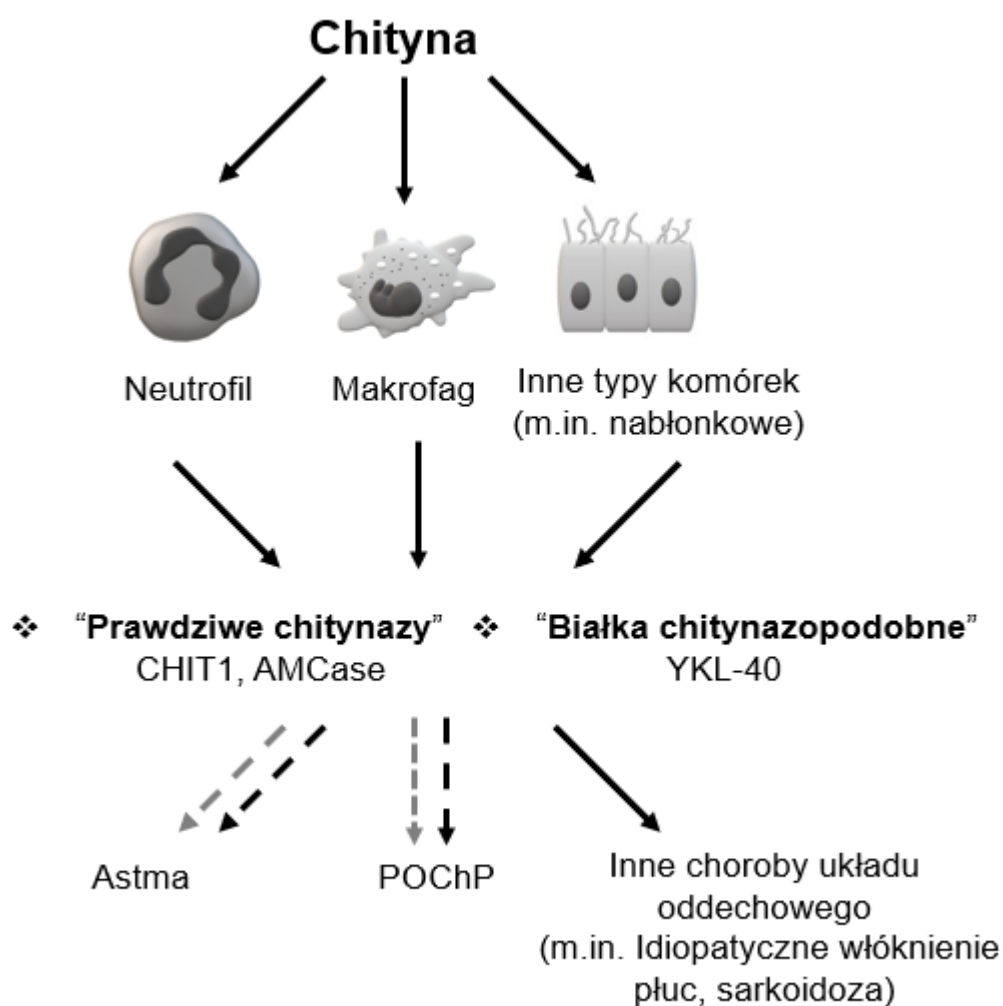
Chitynazy stanowią grupę enzymów należących do hydrolaz, których funkcją jest rozkład chityny – drugiego pod względem częstości występowania biopolimeru na Ziemi [1]. Chityna pełni rolę strukturalną w organizmach wielu gatunków, stanowiąc istotny składnik ścian komórkowych grzybów, nicieni, stawonogów, owadów i skorupiaków, a także niektórych gatunków ryb i płazów [2,3]. Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie i syntetyzowane przez liczne organizmy, począwszy od bakterii, poprzez rośliny, aż po zwierzęta. Uczestniczą w procesach odżywiania, pasożytnictwa oraz w mechanizmach odpornościowych, zarówno wrodzonych, jak i nabytych [4].

Oprócz aktywnych enzymatycznie chitynaz, wiele organizmów wytwarza również białka chitynazopodobne, pozbawione zdolności hydrolizy chityny, lecz pełniące istotne funkcje regulacyjne w odpowiedzi komórkowej i tkankowej. Ludzkie chitynazy należą do rodziny glikozylohydrolaz 18, w obrębie której wyróżnia się dwie zasadnicze grupy: chitynazy o aktywności enzymatycznej – reprezentowane przez chitotriozydazę (CHIT1)

oraz kwaśną chitynazę ssaczą (AMCase) – oraz białka chitynazopodobne (ang. *chitinase-like proteins*, CLPs), zdolne do wiązania cząsteczek chityny, lecz pozbawione właściwości hydrolitycznych [5]. Z klinicznego punktu widzenia najistotniejszym przedstawicielem tej drugiej grupy jest białko podobne do chitynazy-3 typu 1 (CHI3L1), znane również jako YKL-40.

Wspólną cechą chitynaz i białek chitynazopodobnych jest ich potencjalny udział w modulacji odpowiedzi immunologicznej człowieka. Badania naukowe wskazują na związek między podwyższoną aktywnością i zwiększonym stężeniem CHIT1, AMCase oraz YKL-40 a procesami związanymi z aktywacją stanu zapalnego dróg oddechowych i zapalenia stawów, infekcjami, procesami nowotworzenia oraz przebudową strukturalną tkanek, w tym włóknieniem [5-7]. Pomimo rosnącej liczby doniesień naukowych, zakres wiedzy dotyczącej roli chitynaz w fizjologii i patofizjologii człowieka pozostaje wciąż ograniczony. Zrozumienie funkcji oraz mechanizmów ich działania stanowi istotne wyzwanie badawcze i może przyczynić się do identyfikacji nowych biomarkerów oraz potencjalnych celów terapeutycznych w różnych jednostkach chorobowych [6].

Ponieważ chitynazy i białka chitynazopodobne (CLPs) odgrywają znaczącą rolę w odpowiedzi immunologicznej, ich aktywność jest podwyższona w tkankach narażonych na bezpośredni kontakt z czynnikami środowiskowymi i drobnoustrojami. Z tego względu płuca są jednym z kluczowych miejsc, w których należy analizować obecność, aktywność oraz potencjalne znaczenie biologiczne chitynaz i białek chitynazopodobnych. Ogólny pogląd na przebieg zjawisk inicjowanych przez kontakt chityny z komórkami układu oddechowego przedstawiono na Ryc.1.



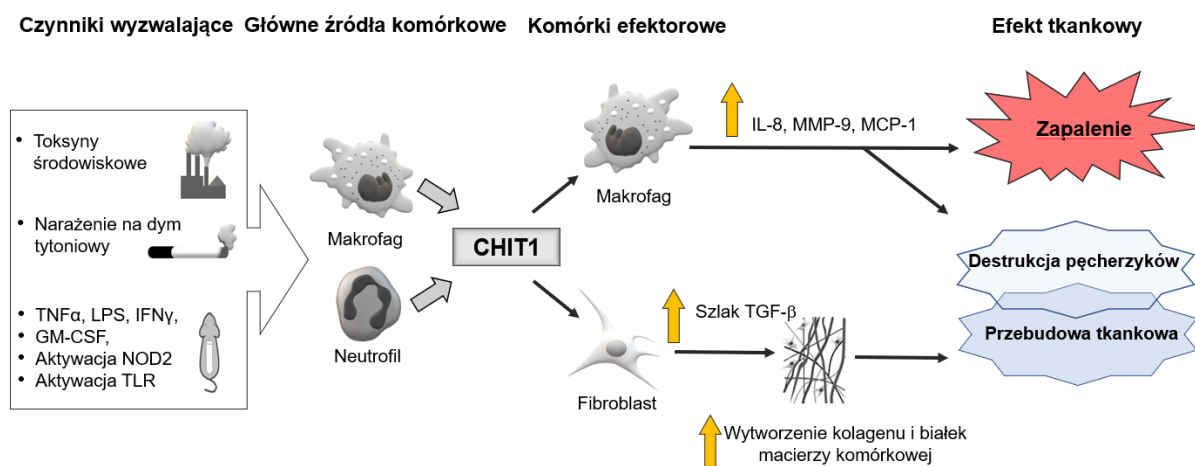
Ryc. 1 Grafika przedstawiająca proces stymulacji chityną komórek- neutrofili, makrofagów oraz innych komórek (m.in. komórek nabłonkowych) i wytwarzanie przez nie chitynaz oraz białek chitynazopodobnych, które w efekcie uczestniczą w patogenezie wielu chorób układu oddechowego. Czarne strzałki wskazują na kierunek działania. Czarne przerywane strzałki oznaczają wpływ negatywny (tj. destrukcyjny), natomiast szare strzałki wskazują na możliwy wpływ pozytywny (tj. ochronny) [7]. AMCase- kwaśna chitynaza, CHIT1- chitotriozydaza, POChP- przewlekła obturacyjna choroba płuc, YKL-40- białko podobne do chitynazy 3 typu 1.

4.1.1. Prawdziwe chitynazy

Chitynazy enzymatycznie aktywne, reprezentowane są przez chitotriozydazę (CHIT1) oraz kwaśną chitynazę ssaczą (AMCase).

4.1.1.1. CHIT1

CHIT1 była pierwszą chitynazą odkrytą u człowieka; zwiększoną jej aktywność zarejestrowano początkowo w chorobie Gauchera [8]. Enzym ten wykazuje zarówno aktywność hydrolityczną, jak i transglikozylacyjną. W płucach człowieka CHIT1 jest wydzielana przez makrofagi pęcherzykowe oraz neutrofile [5]. W warunkach fizjologicznych znaczenie CHIT1 wynika z jego udziału w mechanizmach obronnych przeciwko patogenom zawierającym chitynę, w tym grzybom i owadom. Nowsze badania wykazały, że nadmierna aktywacja CHIT1 może nasilać proces zapalny oraz profibrotyczny, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego, destrukcji pęcherzyków płucnych oraz przebudowy tkanki [7] (Ryc. 2). W ostatnim czasie zwraca się uwagę na potencjalną rolę inhibitorów chitotriozydazy w leczeniu chorób układu oddechowego [9,10].



Ryc. 2 Schemat związków między chitotriozydazą (CHIT1) a patogenezą zapalenia i uszkodzenia płuc. Ekspozycja na dym tytoniowy i inne czynniki zwiększa ekspresję CHIT1 w makrofagach i neutrofilach płucnych. CHIT1 może promować proces zapalny i degradację tkanki (z udziałem m.in. IL-8, MMP-9 i MCP-1) oraz uczestniczyć w rozwoju włóknienia płuc poprzez szlak TGF- β . Strzałki w schemacie przedstawiają odpowiednio: stymulację komórek (biała), wydzielanie CHIT1 (szare), kierunki działania CHIT1 (czarne) oraz nasilenie procesów (żółta) [7]. CHIT1 – chitotriozydaza, GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, IFN- γ – interferon γ , IL-8 – interleukina 8, LPS – lipopolisacharyd, MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów 1, MMP-9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9, NOD2 – białko zawierające domenę oligomeryzacji wiążącą nukleotyd 2, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , TLR – receptor Toll-podobny, TNF α – czynnik martwicy nowotworów α .

4.1.1.2.AMCase

AMCase stanowi kolejną aktywną formą chitynazy w układzie oddechowym. Jej ekspresję wykazano w nabłonku oddechowym oraz makrofagach [5]. W związku z faktem, że kwaśne środowisko jest niezbędne do zainicjowania aktywności enzymatycznej AMCase (optymalne pH o wartości 2) niektórzy autorzy sugerują, że enzym ten może być nieaktywny w ludzkich płucach [11,12]. Dostępne dane wskazują jednak na związek między zwiększoną aktywnością AMCase a astmą i przewlekłym zapaleniem zatok z polipami [13].

4.1.2. Białka chitynazopodobne

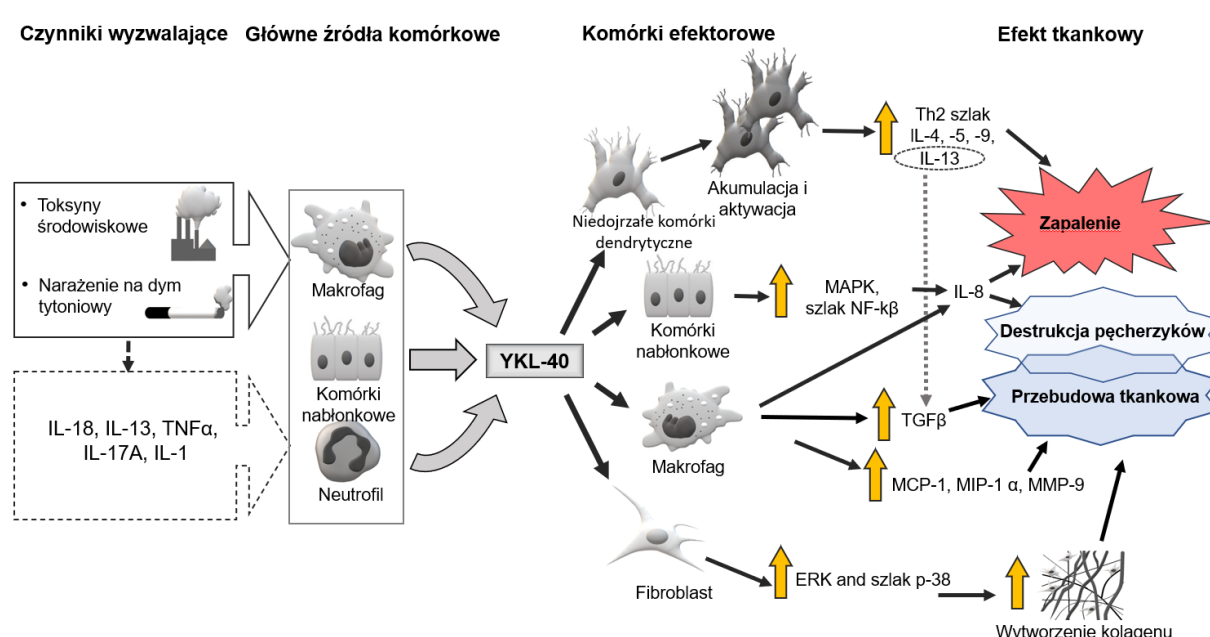
Białka podobne do chitynaz to grupa protein, które nie wykazują aktywności hydrolitycznej, ale utrzymały konserwatywną domenę w obrębie glikozylohydrolaz 18. Efektem tego, jest zdolność do wiązania chityny lub jej cząstek [5]. Przedstawicielami tej grupy są:

- białko podobne do chitynazy 3 typu 1 (CHI3L1), znane również jako YKL-40;
- białko podobne do chitynazy 3 typu 2 (YKL-39);
- mysie białko podobne do chitynazy 3 (Ym1);
- białko podobne do chitynazy wchodzące w interakcję ze stabiliną-1 (SI-CLP);
- owiduktyna.

Najważniejszym i najlepiej opisanym przedstawicielem grupy jest białko YKL-40 [7]. YKL-40 wiąże ligand oligosacharydowy w sposób identyczny jak katalitycznie aktywne chitynaz. Jednakże, w przeciwieństwie do chitynaz, w przypadku YKL-40 wiązanie ligandu oligosacharydowego wywołuje zmianę konformacyjną, która może mieć znaczenie regulacyjne odpowiedzi immunologicznej [14].

W drogach oddechowych YKL-40 jest wydzielane przez makrofagi, komórki nabłonkowe i neutrofile [5,7]. Szlak sygnałowy, prowadzący do aktywacji zapalenia i przebudowy tkankowej jest mediowany przez różnorodne biomarkery (Ryc. 3) [7]. Po raz pierwszy odnotowano wyższe stężenia powyższego biomarkera w płynie stawowym pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów i zapalnymi chorobami stawów [15]. Później stwierdzono podwyższone stężenia białka YKL-40 i jego mRNA w wielu chorobach zapalnych, nowotworach oraz zaburzeniach związanych z przebudową tkanek (m.in. w zapaleniu płuc, nieswoistych chorobach zapalnych jelit, miażdżycy, cukrzycy,

włóknieniu wątroby oraz w nowotworach piersi, wątroby, jajnika, jelita grubego i płuc) [5,16-18]. Wiele danych naukowych sugeruje, że białka chitynazopodobne odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób układu oddechowego [19-21] (Ryc. 3).



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie potencjalnych mechanizmów zaangażowanych w destrukcję mięszu płucnego, zapalenie tkanek oraz ich przebudowę związaną z aktywacją YKL-40. Duża biała strzałka reprezentuje stymulację makrofagów, komórek nabłonkowych oraz neutrofilów przez różne czynniki; cienka przerywana czarna strzałka przedstawia pośredni wpływ czynników środowiskowych; duże szare strzałki wskazują na wydzielanie YKL-40 przez komórki; czarne cienkie strzałki obrazują potencjalne szlaki sygnałowe YKL-40; szara cienka przerywana strzałka przedstawia efekt stymulujący interleukiny 13 (IL-13) na transformujący czynnik wzrostu beta (TGF β); żółta pionowa strzałka oznacza wzrost lub nasilenie [7]. ERK – kinaza serynowo-treoninowa z rodziny MAPK, IL – interleukina, MAPK szlak – szlak kinaz aktywowanych mitogenami, MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów 1, MIP-1 α – białko zapalne makrofagów 1 α , MMP-9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9, NF- κ B – czynnik jądrowy κ B, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , Th2 szlak – szlak odpowiedzi limfocytów T pomocniczych typu 2, TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α , YKL-40 – białko podobne do chitynazy-3 typu 1.

4.2. Rola chitynaz w chorobach układu oddechowego

4.2.1. Astma

Szacuje się, że na astmę choruje ponad 250 milionów osób na świecie (WHO Global Asthma Report 2022) [22]. Ta choroba płuc charakteryzuje się specyficznym typem przewlekłego zapalenia, nadreaktywnością oskrzeli oraz zmiennym, odwracalnym ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Pomimo dostępnych skutecznych form leczenia i szeroko opisywanej jej patofizjologii wciąż wyzwaniem dla klinicystów pozostaje uzyskanie kontroli w przypadku astmy ciężkiej [23].

Wiele badań doświadczalnych i klinicznych oceniało znaczenie chitynaz w astmie. Ciekawe spostrzeżenia dotyczące patogenezы tej choroby wysnuł zespół badaczy kierowany przez Brinchmann, sugerując, że wczesna ekspozycja wziewna na cząsteczki zawierające chitynę może przyczyniać się do rozwoju reakcji alergicznej na powyższy czynnik [24]. Badania oceniające częstość występowania chorób obturacyjnych wśród pracowników przemysłu morskiego i grzybiarskiego, z większą niż populacyjnie ekspozycją na chitynę, wydają się potwierdzać hipotezę nadreaktywności dróg oddechowych w przypadku wysokiego stężenia chityny w powietrzu wdychanym [25,26]. Z drugiej strony, nadmiernie zmniejszona ekspozycja na mikroorganizmy i pasożyty może, zgodnie z hipotezą higieniczną, przyczyniać się do wzmożonej odpowiedzi typu T2 gospodarza. Badania u ludzi wskazują na podwyższone stężenie powyższych biomarkerów u pacjentów z astmą, w szczególności w okresie zaostrzenia objawów [28,29].

W modelach zwierzęcych astmy wykazano jej związek z aktywnością AMCase. Wyniki tych badań sugerują, że enzym ten może być istotnym mediatorem reakcji indukowanej przez IL-13 w chorobach związanych z odpowiedzią Th2 [27]. Opisano również związek między poliformizmem tego enzymu a astmą wieku dziecięcego [30]. Jak wspomniano jednak wcześniej, wydaje się, że pH w obrębie dróg oddechowych jest zbyt wysokie, aby AMCase mógł odgrywać istotną rolę enzymatyczną [11,12].

Wykazano, że duplikacja genu kodującego CHIT1, prowadząca do powstania nieprawidłowo złożonego mRNA i w efekcie syntetyzowania nieaktywnej formy białka CHIT1, może być czynnikiem ryzyka ciężkiej astmy z nadwrażliwością na grzyby, alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej i alergicznego zapalenia zatok [31]. Modele zwierzęce astmy wskazują również na ochronną rolę CHIT1 w patogenezie zapalenia alergicznego i odpowiedzi dróg oddechowych w astmie, prawdopodobnie poprzez regulację ekspresji TGF- β i komórek regulatorowych T (Treg, Foxp3+) [32]. Według

autorów CHIT1 bierze udział w regulacji immunologicznej poprzez wspieranie ekspresji i sygnalizacji TGF- β 1 i dalszą indukcję i akumulację Foxp3⁺ Treg w tkankach zapalnych. Brak chitotriozydazy powoduje przesunięcie równowagi w kierunku silniejszej odpowiedzi Th2, co może pogłębiać alergiczne zapalenie.

Najbardziej interesujące z punktu klinicznego wydają się badania analizujące rolę YKL-40. Wysokie stężenie YKL-40 we krwi koreluje ze stopniem obturacji u pacjentów z astmą oraz zwiększa ryzyko zaostrzeń choroby [33, 34]. Dodatkowo stwierdzono korelację między stężeniem YKL-40 a liczbą neutrofili we krwi i płwocinie, natomiast nie obserwowano takiego związku z eozynofilami [35]. Może to sugerować, że neutrofile są istotnym źródłem YKL-40 w astmie. Z drugiej strony, ponieważ YKL-40 koreluje z czynnikami chemotaktycznymi dla neutrofili (np. Il-8), możliwe jest, że zwiększona liczba neutrofili jest skutkiem wzmożonej ekspresji YKL-40. Być może szlak ten odgrywa rolę w trudnej do leczenia astmie neutrofilowej. Nie można jednak wykluczyć, że YKL-40 jest jedynie markerem przebudowy tkanek, a nie bezpośrednim uczestnikiem patogenezy. Aby to rozstrzygnąć, konieczne są dalsze badania wyjaśniające mechanizmy działania i regulacji YKL-40.

4.2.2. POChP

Kolejną chorobą obturacyjną układu oddechowego, stanowiącą istotny problem kliniczny i społeczny jest przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP). Zgodnie z danymi WHO, w 2021 roku POChP było trzecią najczęstszą przyczyną zgonów na świecie odpowiadając za ok. 3,5 miliona zgonów [36].

Ekspozycja na dym tytoniowy, szkodliwe gazy i pyły, a także alergenów pobudza wydzielanie mediatorów (m.in. interleukin- Il-1,-13,-17A, -18, GM-CSF i TNF- α) stymulujących neutrofile, makrofagi i komórki nabłonkowe dróg oddechowych do produkcji YKL-40 i CHIT1 [5, 12, 37-43]. Chitynazy i białka chitynazopodobne stymulują wydzielanie prozapalnych i profibrotycznych mediatorów, takich jak Il-8, MMP-9, MCP-1, MIP-1 α oraz TGF- β , które uczestniczą w patofizjologii przewlekłego zapalenia, odkładania macierzy pozakomórkowej i nadmiernej produkcji kolagenu, co, w konsekwencji prowadzi do nieodwracalnej destrukcji i remodelingu pęcherzyków płucnych [37,44,45]. Dodatkowo wykazano, że nadmierna ekspresja YKL-40 stymuluje wydzielanie Il-8 i prowadzi do proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich oskrzeli poprzez stymulację szlaku MAPK i NF- κ B [44]. Efektem tych działań jest nasilony remodeling dróg oddechowych, zmniejszenie elastyczności płuc oraz postępujące

zwięźenie dróg oddechowych, co skutkuje zwiększeniem stopnia obturacji. Przeprowadzona metaanaliza wykazała, że podwyższone stężenia YKL-40 w surowicy negatywnie korelują z wartością FEV1 w.nal., co wskazuje na ich związek z pogarszającą się funkcją płuc i ciężkością choroby [21]. Współdziałanie CHIT1 i YKL-40 w aktywacji szlaków zapalnych, fibrogenyzy i remodelingu sugeruje ich możliwy udział w rozwoju POChP, a także wskazuje na ich potencjalną rolę diagnostyczną i terapeutyczną. Przeprowadzono szereg badań oceniających znaczenie chitynaz w patogenezie POChP. Część badaczy wskazuje, że stężenia powyższych białek, zarówno w surowicy, jak i w płwocinie indukowanej i płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF), są wyższe u palaczy z POChP w porównaniu z palaczami bez stwierdzonej choroby i osobami, które nigdy nie paliły [37,38].

Z drugiej strony, AMCase prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli ani u pacjentów z POChP, ani u zdrowych palaczy. Stężenia tej chitynazy w BALF był poniżej progu wykrywalności testu ELISA [37].

4.2.3. Przewlekłe zapalenie indukowane ekspozycją na dym papierosowy

Wiele czynników, w tym toksyny środowiskowe oraz ekspozycja na dym tytoniowy, może zwiększać produkcję chitynaz i białek chitynazopodobnych (Ryc. 2 i Ryc. 3). Palenie wiąże się ze zwiększoną ekspresją genów kodujących chitynazy, a stężenia chitynaz są wyższe u osób palących niż u osób, które nigdy nie paliły [37,38]. Może to być związane z faktem, że liście tytoniu są powszechnie zakażone organizmami grzybiczymi, zawierającymi chitynę. Mając na uwadze powyższe dane, Seibold i wsp. przedstawili hipotezę, że polimerowa chityna obecna w dymie papierosowym może aktywować makrofagi oraz komórki nabłonka dróg oddechowych, a także zwiększać ekspresję i wydzielanie chitynaz [12]. Należy jednak podkreślić, że wciąż niejasne pozostaje, czy podwyższone stężenie chitynaz jest markerem rozwoju POChP, czy jest wtórne do stanu zapalnego w drogach oddechowych wynikającego z ekspozycji na szkodliwe czynniki, głównie te obecne w dymie tytoniowym.

4.2.4. Wyсіk gruźliczy

Prawidłowy płyn opłucnowy powstaje zwykle jako przesącz z naczyń włosowatych opłucnej ściennej, a odpływa drogą naczyń limfatycznych [45]. Gromadzenie się nadmiernej ilości płynu opłucnowego jest efektem zaburzenia tych procesów. Zgodnie z ogólnie przyjętymi kryteriami, płyny w jamie opłucnej dzieli się na

przezięki i wysięki [46]. Przezięki są spowodowane zwiększym cięniem hydrostatycznym (np. niewydolnoř serca), zmniejszonym cięniem onkotycznym (np. hipoproteinemia), zwiększym ujemnym cięniem w jamie opłucnej (np. niedodma) lub przemieszczaniem się płynu puchlinowego z jamy brzusznej przez przeponę (np. wodobrzusze opłucnowe w przebiegu chorób wątroby). Natomiast wysięki powstają w wyniku zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych i/lub upořdzonego drenażu limfatycznego, będących skutkiem procesów rozrostowych (np. nowotwory) lub zapalnych (np. wysięki parapneumoniczne, gruźlicze) [47]. Biorąc pod uwagę powyższe różnice w patofizjologii, wydaje się, że chitynazy nie powinny odgrywać istotnej roli w przeziękach. Natomiast w przypadku płynów wysiękowych, których tworzenie w istotnym stopniu związane jest z procesami zapalnymi, takiej roli nie można wykluczyć. W związku z opublikowanymi wcześniej przez zespół badawczy wynikami badań, wskazującymi, że chitynazy wykazują istotną ekspresję w ziarniniakach sarkoidalnych [9], uznaliśmy, że ocena ekspresji chitynaz w ziarniniakach gruźliczych oraz ich stężenia w wysięku gruźliczym może wnieř nie tylko istotny aspekt poznawczy, ale może mieć pewną wartość diagnostyczną (w razie uzyskania pozytywnych wyników w płynie opłucnowym i biopsjach). Pomimo, że diagnostyka płucnej postaci gruźlicy jest stosunkowo prosta i łatwo dostępna, to sytuacja jest zgoła odmienna w przypadku wysunięcia podejrzenia wysięku o etiologii gruźliczej. Według danych z 2024 r. najczęstszą postacią gruźlicy pozapłucnej w Polsce jest gruźlicze zapalenie opłucnej – powyższe przypadki stanowiły 3,9% ogółu chorych z rozpoznaną gruźlic [48]. Trzeba jednak podkreślić, że wysięki gruźlicze zdarzają się częściej, co wynika z faktu, że w przypadku współwystępowania zmian w mięszu płucnym przypadki te są raportowane jako gruźlica płuc. W krajach o wysokiej zapadalności na gruźlicę, zakażenie prątkiem kwasoopornym jest odpowiedzialne w 33% za gromadzenie płynu w jamach opłucnowych [49]. Główne wyzwania diagnostyczne związane z rozpoznaniem gruźliczego wysięku wynikają z ograniczonej czułości i niskiej wartości predykcyjnej wyniku ujemnego testów mikrobiologicznych w wykrywaniu *Mycobacterium tuberculosis* lub jej DNA w płynie opłucnowym [50]. Efektem tych ograniczeń, jest ciągle poszukiwanie markerów wysięku gruźliczego (obecnie znaczenie kliniczne ma przede wszystkim deaminaza adenozy- ADA) [50]. Analiza dotychczasowych danych literaturowych wykazała, że rola chitynaz w etiologii wysięków nie jest jednoznaczna, a etiologia płynu, w którym stężenie tych biomarkerów jest najwyższe jest różna [51-53]. Częć z badań wskazuje, że powyższe biomarkery mogą odgrywać rolę w patogenezie

gruźliczego wysięku [53,54]. Co więcej, aktywność CHIT1 obniża się w trakcie leczenia przeciwprątkowego i koreluje z ciężkością choroby [55]. Mając na uwadze uzyskane wcześniej dane, wskazujące na podwyższoną ekspresję CHIT1 w ziarniniakach sarkoidalnych [9], ciekawym do oceny aspektem jest ocena aktywności chitynaz w ziarniniakach gruźliczych, ich znaczenie w procesie tworzenia gruźliczego wysięku i finalnie ocena, jaką rolę diagnostyczną mogą odgrywać CHIT1 oraz YKL-40.

5. Założenia i cele pracy

W badaniach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej skoncentrowałam się na scharakteryzowaniu stężenia, aktywności i ekspresji chitynaz w materiałach biologicznych pozyskanych od pacjentów z wybranymi chorobami układu oddechowego, takimi jak POChP, z zapaleniem dróg oddechowych indukowanym dymem papierosowym oraz z płynem w jamie opłucnej. Uzupełnieniem tych celów była odpowiednia interpretacja uzyskanych danych, wnioskowanie i wskazanie kierunków przyszłych badań.

Główny cel rozprawy obejmował realizację następujących celów szczegółowych:

1. Przegląd światowej literatury dotyczącej roli chitynaz w patogenezie i diagnostyce wybranych chorób układu oddechowego (m.in. astma i POChP) i określenie braków w aktualnej wiedzy dotyczącej powyższych biomarkerów.
2. Porównanie stężeń CHIT1 i YKL-40 oraz aktywności CHIT1 w płwocinie indukowanej u zdrowych ochotników, osób palących papierosy, bez stwierdzonej choroby układu oddechowego oraz pacjentów z POChP.
3. Ocena związków między stężeniem i aktywnością chitynaz, a wybranymi markerami stanu zapalnego (tj. całkowitej liczby komórek w płwocinie, liczby neutrofili, makrofagów, stężenia interleukiny 6 (Il-6), Il-8, Il-18 oraz MMP-9).
4. Analiza klasterowa pacjentów pozwalająca na wyznaczenie profili klinicznych badanych grup w kontekście ekspozycji na dym tytoniowy.
5. Ocena stężenia YKL-40 oraz CHIT1 w płynach z opłucnej o różnej etiologii, ze szczególnym uwzględnieniem gruźliczego wysięku.
6. Ocena ekspresji komórkowej chitynaz w bioptatach z opłucnej pacjentów ze zdiagnozowanym gruźliczym wysiękiem.
7. Oszacowanie wartości diagnostycznej CHIT1 i YKL-40 jako potencjalnych biomarkerów wysięku gruźliczego

6. Kopie opublikowanych prac

Chitinases and Chitinase-Like Proteins in Obstructive Lung Diseases – Current Concepts and Potential Applications

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Natalia Przysucha
Katarzyna Górka 
Rafał Krenke 

Department of Internal Medicine,
Pulmonary Diseases and Allergy, Medical
University of Warsaw, Warsaw, Poland

Abstract: Chitinases, enzymes that cleave chitin's chain to low molecular weight chitooligomers, are widely distributed in nature. Mammalian chitinases belong to the 18-glycosyl-hydrolase family and can be divided into two groups: true chitinases with enzymatic activity (AMCase and chitotriosidase) and chitinase-like proteins (CLPs) molecules which can bind to chitin or chitooligosaccharides but lack enzymatic activity (eg, YKL-40). Chitinases are thought to be part of an innate immunity against chitin-containing parasites and fungal infections. Both groups of these hydrolases are lately evaluated also as chemical mediators or biomarkers involved in airway inflammation and fibrosis. The aim of this article is to present the current knowledge on the potential role of human chitinases and CLPs in the pathogenesis, diagnosis, and course of obstructive lung diseases. We also assessed the potential role of chitinase and CLPs inhibitors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease and asthma.

Keywords: asthma, COPD, YKL-40, CHIT1, chitotriosidase, AMCase

Background

Chitin is the second (after cellulose) most abundant biopolymer on Earth,¹ mainly forming various building block structures of fungi, mollusks, arthropods, and other invertebrates.² Its major unique features include water insolubility and high resistance to mechanical stress and degradation. The utility of chitin-containing products has been recognized and, since many years, chitin has been widely used for commercial purposes: in agriculture, food industry, pharmacy or biomedical industry.^{3–5} Chitin is an enzymatic product of chitin synthases and requires specific enzymes – referred to as chitinases – for its degradation. Although it had previously been assumed that vertebral tissues contain no chitins and chitinases, in the light of recent studies, this assumption seems to be no longer valid.⁶ Endogenous chitin can be found in some vertebrates, including fish and amphibians.⁷ In general, human organisms are not able to produce chitin due to the absence of chitin synthases. However, minute amounts of chitin can be detected in humans. They either have external sources or may have the form of short-chain oligomers associated with hyaluronic acid synthesis.^{6,8} Thus, the lack of chitin synthases does not a priori exclude the presence of chitin in human tissues. It seems that under some circumstances even minute amounts of chitin or chitin-like polysaccharides can accumulate and contribute to human pathology, eg, in certain forms of Alzheimer's disease.⁹ Considering the high prevalence of chitin and the fact that the

Correspondence: Katarzyna Górka
Department of Internal Medicine,
Pulmonary Diseases and Allergy, Medical
University of Warsaw, Banacha 1A,
Warsaw 02-097
Email drkpgorska@gmail.com

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress    
<http://dx.doi.org/10.2147/IJOPD.S236640>

International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2020:15 885–899

885

 © 2020 Przysucha et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing this work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

immunological reaction to this polysaccharide is thought to be time- and dose-dependent, the above issue seems to have at least potential clinical implications.¹⁰ Nevertheless, the role of chitin in humans is still obscure.

Chitinases, enzymes that cleave chitin's chain to low molecular weight chitooligomers, are widely distributed in nature. These enzymes are produced by bacteria, fungi, plants, actinomycetes, arthropods and vertebrates.¹¹ Curiously, albeit the human genome is completely void of genes for chitin synthases, it does contain several genes encoding different human chitinases.¹² Moreover, these genes are active and proteins with potent chitinolytic activity can be detected in different human tissues. This phenomenon is intriguing in the context of only a trace amount of chitin in human organisms. At least in part, chitinases probably represent a defensive mechanism against chitin-containing parasites and fungal infections.¹³ In addition, these enzymes may also play a role in destroying potent chitin antigens. Nonetheless, it must be admitted that our current knowledge on the place of chitinases in human physiology and pathophysiology is highly unsatisfactory.

Human chitinases belong to 18-glycosyl-hydrolases (GH18). Within the family of GH18, we can distinguish two groups based on their activity:¹⁴

- enzymatically active chitinases, represented by chitinotriosidase (CHIT1) and acid mammalian chitinase (AMCase);
- chitinase-like proteins (CLPs), a group of several proteins which do not have hydrolytic activity but are still capable of binding chitin or chitin's particles.^{15–17} The most important representatives of this group are:
 - chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), also known as YKL-40 with animal homologue-BRP-39 (mouse breast regression protein 39);
 - chitinase 3-like protein 2 (YKL-39);
 - murine chitinase-like 3 protein (Ym1);
 - stabilin-1-interacting chitinase-like protein (SI-CLP);
 - oviductin.

Enzymatically active chitinases (true chitinases), ie, CHIT1 and AMCase, have been identified in different mammals including humans and laboratory animals (eg, mice). Humans and other mammals also produce YKL-40 (with mouse homologue BRP-39), oviductin and SI-CLP. Chitinase 3-like protein 2 (YKL-39) was found in humans but was absent in rodents.¹⁸ Animal studies indicate the

role of eating behaviors in chitinase gene expression. Higher AMCase enzyme and mRNA levels were found in omnivores (eg, pigs, chickens, monkeys) than in herbivores (eg, bovines) and carnivores (eg, dogs).^{19,20} The highest levels of chitinase expression were reported in the lungs, stomach, kidney, and liver.^{19,20} It may be hypothesized that a higher exposure to chitin-containing organisms results in the overexpression of chitinase genes.²¹ It is worth to note, however, that chitinase genes are not always present in the genome (ie, according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genome database, the CHIT1 gene is absent in the dog genome). The lack of chitinase gene in some species may lead to lower chitin digestibility and a reduced tolerance to overfeeding with chitin-containing food.¹⁹

From the clinical perspective, CHIT1, AMCase and YKL-40 seem to play the most significant role in different human diseases. A common feature of the above enzymes is their potential involvement in the human immune response. Hence, the majority of studies have been focused on these molecules. These studies demonstrated various relationships between the level of CHIT1, AMCase or YKL-40 and different human diseases and pathologies, such as infections, cancer, chronic pulmonary disorders, arthritis, fibrosis, tissue remodeling, and others.^{12,14} The association of other CLPs with human diseases has been poorly addressed and both the number and the quality of data are limited, eg, YKL-39 was reported to be involved in osteoarthritis, whereas SI-CLP probably plays a role in Th-2 induced allergies.¹⁴ Since chitinases and CLPs are believed to play an active role in human immune defense, their activity should be expressed mainly in locations with high exposure to microorganisms. This refers to the lungs which are exposed to approximately 10,000 liters of air contaminated with various potential pathogens per day.^{22,23} Moreover, the most common diseases of the lower respiratory tract such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) have a strong relationship with inhaled antigens and air pollution. Therefore, the respiratory system seems to be one of the major sites in which the presence and activity of chitinases should be considered. The possible role of chitin, chitinases and CLPs in pulmonary diseases is shown in Figure 1.^{6,18,24} The aim of this article is to present the current knowledge on the potential role of human chitinases and CLPs in the pathogenesis, diagnosis, and course of obstructive lung diseases. In particular, two major aspects that are critical from a clinical perspective will be reviewed: their role in

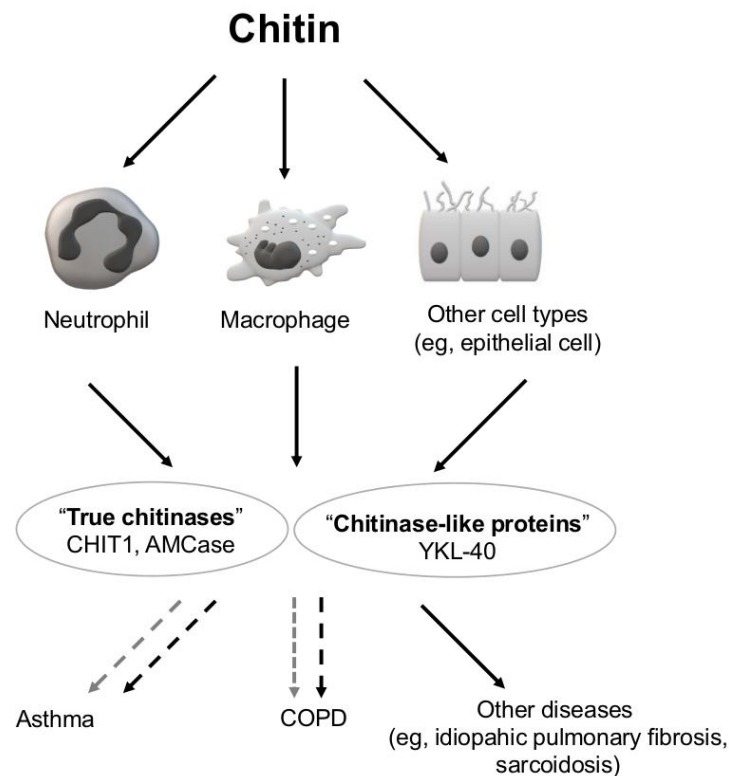


Figure 1 Schematic depiction of chitin, chitinases and chitinase-like proteins (CLPs) involvement in lung diseases.

Notes: Exposure to chitin may trigger the secretion of chitinases and CLPs from neutrophils, macrophages and other cells (solid-line black arrows show cell activation after chitin exposure and secretion of chitinases). Both groups of enzymes are thought to play a role in the pathogenesis of pulmonary diseases (eg, asthma and COPD). Black dashed arrows reflect a negative (ie, destructive) effect, while the grey dashed arrows show a possible positive (ie, protective) influence. See manuscript text for more details.

pathogenesis as a potential target of therapeutic intervention and the role as biomarkers characterizing specific features of the disease.

Basic Characteristics of Selected Chitinases and CLPs Potentially Involved in Human Pathophysiology

Chitotriosidase

CHIT1 was the first true chitinase discovered in humans.²⁵

This enzyme has a hydrolytic and trans-glycosylation activity.¹⁴ Elevated levels of CHIT1 have been first described in patients with Gaucher disease and later, in a variety of diseases (eg, acute and chronic infections,

neurodegenerative diseases and other).^{14,25} In the human lung, CHIT1 is prominently expressed by alveolar macrophages and neutrophils and it is said to play an active role in the innate immune response.^{26–28} Under normal conditions, the importance of CHIT1 results from its role in the defense against chitin-containing human pathogens, including fungi and insects.²⁸ CHIT1 may stimulate alveolar macrophages and enhance tissue inflammation.²⁷ However, the exact mechanism of CHIT1 action has not been fully explained.

Acid Mammalian Chitinase

In 2001, a new enzyme with chitinolytic activity – AMCase – was discovered.²⁹ It has been shown that AMCase has hydrolytic activity in the gastrointestinal

tract and lungs and that it may play a role in digestion and/or immune defense.³⁰ The enzyme is acid stable, has an optimal pH around 2 and an acidic environment is required to initiate AMCase enzymatic activity.³¹ This may suggest that the highest enzymatic activity can be found in gastric mucosa.²⁰ AMCase is expressed by lung epithelial cells and macrophages. AMCase mRNA expression and the number of AMCase-positive cells are upregulated during Th2 inflammation. This phenomenon has been demonstrated mainly in asthma (in lung epithelial and subepithelial cells) but also in chronic rhinosinusitis with nasal polyps (in ethmoid mucosa).^{30,32} The above effects were found to be mediated mainly through IL-13.^{30,33,34} Although AMCase was detected in gastric mucosa, it did not correlate with the presence of *H. pylori* and inflammation.³⁵ The role of AMCase in the human respiratory system has not been adequately investigated and some authors suggested that this enzyme could be inactive in human lungs.³⁶

Chitinase-3-Like Protein 1

YKL-40, a 40 kDa plasma protein, is the best-known protein from the CLPs group. YKL-40 lacks chitinolytic activity due to the mutation of glutamic acid to leucine in the chitinase-3-like catalytic domain.²⁷ The expression of YKL-40 was found in different mammalian organs and tissues (ie, humans, cows, mice, goats).^{37–40} The enzyme is secreted by macrophages, epithelial cells, neutrophils, chondrocytes, synoviocytes, vascular smooth muscle cells and cancer cells.^{41,42} Studies which used human lung specimens and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) showed the expression of YKL-40 in the cytoplasm of neutrophils and macrophages both in healthy subjects and patients with obstructive airway diseases.^{43,44} Nevertheless, the role of this protein is somewhat controversial. It does not have any enzymatic activity but it is believed to be involved in the regulation of cell proliferation, adhesion, migration and activation.¹⁴ Higher concentrations of YKL-40 in synovial fluid from patients with osteoarthritis and inflammatory joint diseases were reported already in 1993.⁴⁵ Later, elevated concentration of YKL-40 protein and mRNA were noted in many inflammatory diseases, malignancies and disorders associated with tissue remodeling (ie, pneumonia, inflammatory bowel disease, atherosclerosis, diabetes, liver fibrosis, and breast, liver, ovarian, colon or lung cancer).^{46–50} To date, YKL-40 has been the most extensively evaluated chitinase in patients with obstructive lung diseases.

The Role of Chitinases and CLPs in Obstructive Lung Diseases

The knowledge on the pathogenesis of obstructive airway diseases has significantly evolved in the last decades but the mechanisms of airway inflammation and obstruction are still not completely understood. The role of chitinases and CLPs in asthma and COPD has been evaluated with the perspective that better understanding of the complex relationships between different mechanisms involved in the pathogenesis of these two diseases may become a prerequisite for the development of more personalized treatment and improvement of its effectiveness.

The Role of Chitinases and CLPs in Asthma

Asthma is a common airway disease characterized by a relatively specific type of chronic airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and variable, reversible airflow limitation. According to the Global Initiative for Asthma (GINA) 2019 report, 300 million people worldwide suffer from this disease.⁵¹ Untreated or inadequately treated asthma causes respiratory symptoms, reduces daily activity and quality of life, increases the risk and severity of exacerbations, including life-threatening events. Although the proportion of patients with severe asthma is rather small (usually reported between 3% and 8%), it is responsible for a significant proportion (20.6%) of total costs of treatment.^{52–54} Therefore, a better understanding of the phenotype and endotype of severe asthma may not only improve the efficacy of treatment but also significantly reduce its cost.⁵⁵

The high prevalence of asthma and chronic cough among people exposed to chitin-containing compounds (eg, working in seafood or fungi manufactures) may suggest the importance of chitin in asthma pathogenesis.^{56,57} It is possible that chitin may act as an airborne endotoxin that triggers airway hyperresponsiveness. On the other hand, early exposition to chitin may also result in hypersensitization to chitin as an allergen.⁵⁸ These observations are consistent with the hygiene hypothesis, which emphasizes the importance of early childhood exposure to infections, microorganisms, and parasites in the proper development of the immune system. Thus, it has been hypothesized that a reduced number of infections with chitin-containing pathogens could contribute to the exaggerated Th2 response of the host which involves such Th2

cytokines as IL-4, IL-5 and IL-13 and may provoke hyper-responsiveness of the airways.^{30,59}

There has been a number of human and experimental studies on chitinases and chitinase-like proteins in asthma. Human studies revealed that the levels of these proteins in asthmatics are higher than in control subjects. In most of the studies, chitinase levels were measured in serum and induced sputum.^{60–62} Less commonly, BALF, and bronchial biopsies obtained by bronchoscopy or specimens from resected lung were used to measure chitinase activity and expression.^{36,64,65}

Chitinases and CLPs in Animal Models of Asthma

Several studies showed that AMCase plays a role in animal models of asthma. The results of these studies imply that the enzyme can be an important mediator of IL-13-induced response in Th2-related conditions.^{30,64} A significant increase of AMCase mRNA and protein was detected in the lung of ovalbumin (OVA)-sensitized mice (aeroallergen asthma model).³⁰ AMCase was significantly upregulated after 2 weeks of house dust mite (HDM) exposure in the murine model, while increased expression of this enzyme was not observed following cigarette smoke exposure.⁶⁵ The above data suggest that AMCase can be regarded as a marker of allergic airway inflammation.⁶⁵ HDM-induced mouse model of asthma was also used to evaluate the impact of selective AMCase inhibitor (compound 7f) on allergic airway inflammation. The study showed the effectiveness of this compound in reducing the number of inflammatory cells in BALF and total IgE concentration in serum. These changes correlated with the decrease of chitinolytic activity in BALF.⁶⁶

Another selective AMCase inhibitor also reduced allergic inflammation (eosinophilia) but its application was associated with unexpected serious side effects, including neutrophilia, an increase in macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α) secretion and alterations in airway remodeling genes (resulting in increased procollagen I, matrix-metalloprotease-12 (MMP-12), and Ym1 production).⁶⁷ It has to be determined whether these serious adverse events were directly drug-induced or were the result of the altered eosinophil/neutrophil balance.

An animal study on the impact of CHIT1 on allergic asthmatic reaction led to some surprising conclusions.⁶⁸ The CHIT1-deficient mice demonstrated the enhanced allergic Th2 inflammatory, cytokine and IgE responses to OVA or HDM allergen sensitization and challenge. A possible protective role

of CHIT1 in the pathogenesis of allergic inflammation and asthmatic airway responses is considered to be mediated by regulating transforming growth factor-beta (TGF-β) expression and Foxp3+ regulatory T cells (Treg).⁶⁸ BRP-39, an animal homologue of YKL-40, also plays an important role in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and tissue remodeling.⁶⁹ The involvement of this CLP in multiple immunological responses includes antigen sensitization, immunoglobulin E induction, stimulation of dendritic cell accumulation and activation, induction of alternative macrophage activation, inhibition of eosinophil, T cell, and macrophage apoptosis.⁶⁹

Chitinases and CLPs in Childhood Asthma

One study that included 322 children with asthma, 270 adult and 565 pediatric controls, demonstrated an association between polymorphism of genetic variants of AMCase and childhood asthma.⁷⁰ In contrast, mutations in CHIT1 did not seem to significantly affect asthma prevalence and severity.⁷¹ Nevertheless, gene analysis of six children with severe asthma with fungal sensitization (SAFS) demonstrated that CHIT1 duplication may be a risk factor for SAFS, allergic bronchopulmonary aspergillosis and allergic fungal sinusitis.⁷² An association between the serological features of fungal infection (fungal-specific IgG and IgA reactivity) and higher BALF chitinase activity was reported in asthmatic children.⁷³

Compared to non-asthmatics, children with asthma had increased YKL-40 levels in serum and BALF.^{61,73} Higher serum YKL-40 levels correlated with the fraction of exhaled nitric oxide, blood neutrophils, and bronchial wall thickening on high-resolution computed tomography.⁶¹ Konradsen et al suggested that YKL-40 might be a risk factor of a worse course of the disease and resistance to standard therapy.⁶¹ However, it must be stressed that other authors do not share this opinion.⁷⁴

Chitinases and CLPs in Adult Asthma

Numerous studies analyzed the role of YKL-40 in adult asthma. In general, the results of these studies suggested a relationship between the level of this enzyme and asthma, its severity and the level of asthma control.^{44,61,75} Serum YKL-40 and CHIT1 were elevated in patients with asthma and their levels correlated with the degree of airway obstruction and the risk of exacerbation.^{60,76,77} There was also a weak but statistically significant correlation between serum YKL-40 level and CHIT1 activity in patients with obstructive airway diseases.⁶⁰ Chupp et al found that patients

with elevated serum levels of YKL-40 used significantly more rescue inhalers, required higher doses of oral corticosteroids and had a higher rate of hospitalization than patients with lower YKL-40 levels.⁷⁸ These authors also demonstrated an increased local expression of YKL-40 in bronchial mucosa in patients with severe asthma compared to the healthy control. Importantly, local YKL-40 expression correlated with serum YKL-40 level.⁷⁸ Other authors showed a significant increase in YKL-40 level in induced sputum (IS) after allergen bronchial provocation in patients with atopic asthma.⁶²

An interesting study on the relationship between serum levels of YKL-40 and a specific asthma phenotype was published by Specjalski et al.⁴⁴ The study included 167 patients with three different phenotypes of chronic asthma: early-onset atopic, late-onset non-atopic, and obesity-related asthma. The authors demonstrated significant differences between serum levels of YKL-40 in the three asthma phenotypes, with the highest YKL-40 levels in patients with the obesity-related disease. Serum levels of the enzyme were significantly higher in asthmatics with a high level of symptoms and exacerbations compared to patients with well-controlled disease as well as in atopic compared to non-atopic asthmatics.⁴⁴ The positive correlation between serum and sputum concentrations of YKL-40 in asthmatic subjects and truncal adiposity was confirmed by another study.⁷⁹ Moreover, the authors found that a high-fat diet augmented the pulmonary expression of YKL-40 (animal study). It was probably due to inflammatory, repair, and remodeling responses mediated by this CLP (probably partially mediated by interaction with Sirtuin 1).

A fascinating issue which may be, at least to some extent, linked to the relationship between severe asthma and high serum YKL-40 levels are the characteristics of inflammation associated with increased YKL-40 expression. Studies on sputum and serum YKL-40 level in asthma and COPD revealed a positive correlation with blood and sputum neutrophil count.^{43,80} At the same time, there were no correlations between chitinase concentrations (both YKL-40 and CHIT1) and blood eosinophils count either in asthma or in COPD patients.⁶⁰ This pattern of YKL-40 correlation with the number of neutrophils but not the number of eosinophils may suggest that neutrophils are an important source of YKL-40 in asthma.⁴³ On the other hand, as the correlation between the level of YKL-40 and some chemotactic factors for neutrophils (eg, IL-8)

was reported, it might also be hypothesized that the increased number of neutrophils is an indirect effect of enhanced expression of YKL-40. Correlations between sputum YKL-40 and the levels of myeloperoxidase, IL-8, IL-6, and IL-5 in patients with severe asthma were observed by Hinks et al.⁸¹ Additionally, Tang et al showed that YKL-40 induced IL-8 expression in bronchial epithelium via a mitogen-activated protein kinase (MAPK: c-Jun N-terminal kinases – JNK and extracellular signal-regulated kinase – ERK) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration.⁸² Considering the inability of corticosteroids to ameliorate neutrophilic asthma and neutrophil-generated overexpression of mediators aggravating airway remodeling [ie, TGF- β , IL-8, metalloproteinase 9 (MMP-9), elastase],^{83–85} the correlation between YKL-40 and neutrophil cells in asthma is still uncertain and intriguing. All the above data seem to be consistent with clinical observations linking YKL-40 with severe, therapy-resistant asthma. However, it cannot be excluded that YKL-40 is only a marker of extracellular tissue remodeling. Whether YKL-40 is only an independent marker of airway inflammation or it is truly involved in asthma pathogenesis still needs to be elucidated. This requires a more comprehensive explanation of the exact mechanism of YKL-40 stimulation and action.

Of the three discussed chitinases, the most controversial data on the involvement in asthma pathobiology refer to AMCase. Zhu et al found that AMCase is expressed in lung tissue samples from patients with asthma but seems to be inactive in human lungs.^{30,36} Despite the fact that airway pH in patients with acute asthma is lower compared to healthy control (pH 5.23 vs pH 7.65),⁸⁶ the rate of airway acidification may be still insufficient for the optimum AMCase activity. The lack of AMCase bioactivity may, at least partially, result also from the increased pH in the airways during inhaled or systemic corticosteroid treatment.^{30,31,86,87} The lack or lower chitinolytic activity of human AMCase compared to the chitinolytic activity of mice AMCase may also result from evolutionary mutations of chitinase genes.⁸⁸ These processes lead to amino acid substitutions (some specific amino acids in human AMCase are not present in mice AMCase) and, probably, synthesis of a nonfunctional enzyme.

The Role of Chitinases and CLPs in COPD

Chronic obstructive pulmonary disease is another common chronic lung disease with high morbidity and mortality worldwide. It has been estimated that 328 million people suffer from COPD and according to the newest WHO report, it is the third leading cause of death worldwide.^{89,90} Airway inflammation, obstruction and remodeling, as well as structural changes in lung parenchyma belong to the most important features of COPD. These processes produce clinical symptoms (ie, dyspnea, productive cough, exercise intolerance) which are directly associated with irreversible and progressive airflow limitation, manifested particularly during disease exacerbations. COPD significantly reduces the quality of life and leads to physical disability. The main cause of COPD is tobacco smoke exposure and air pollution. Despite a significant progress in the understanding of the complex COPD pathophysiology, there are still many unresolved questions (ie, why COPD develops only in some smokers). In consequence, the effectiveness of treatment seems to be highly unsatisfactory.

An interesting concept of the relationship between COPD, chitin, and chitinases was proposed by Seibold et al.³⁶ These authors suggested that smoking is associated with higher airway exposure to chitin. This suggestion was based on the fact that tobacco leaves are commonly infected with fungal organisms.³⁶ Some years earlier, Verveij et al showed that commercially available cigarettes and marijuana (semi-legally sold in the Netherlands) were heavily contaminated with fungal spores.⁹¹ *Aspergillus fumigatus* was the most frequently isolated organism from cigarettes, while *Penicillium* genus predominated in marijuana. Bearing in mind the above data, Seibold et al presented the hypothesis that polymeric chitin, present in cigarette smoke, might activate macrophages and airway epithelial cells and increase chitinase expression and secretion.³⁶

Studies evaluating the role of chitinases in the pathophysiology of COPD have been conducted since 2008⁹² and include both a human and animal models. However, it should be emphasized that the number of publications on COPD is significantly smaller than on asthma.

Chitinases and CLPs in Animal Models of COPD

A study in the murine model of COPD showed that cigarette smoke (CS) exposure did not change the level of AMCase in the murine lung.⁶³ In contrast, an experimental study in the mouse model showed that exposure to CS led

to higher YKL-40 accumulation in airway epithelial cells, alveolar macrophages, alveolar type II cells and an increase in YKL-40 mRNA concentration.⁹³ Importantly, the authors documented that YKL-40 was induced by an IL-18-dependent pathway. An immunohistochemistry study demonstrated that the overexpression of CHIT1 in a mouse lung pretreated with an adenoviral vector carrying full-length CHIT1 was localized mainly in the bronchial and bronchiolar epithelium and tissue macrophages.²⁷ CHIT1 overexpression promoted inflammation in the airways (as in COPD) manifested by a higher number of total cells, alveolar macrophages, and higher amounts of the murine homologue of IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in BALF.²⁷ Interestingly, the study by Matsuura et al demonstrated the protective role of YKL-40 against CS-induced lung injury.⁹³ The lack of this enzyme resulted in more pronounced CS-induced lung emphysema, mainly through the up-regulation of the CS-induced cell death response. Thus, the authors suggested that proper chitinase levels might play a protective role in preventing lung destruction.⁹⁴ These pleiotropic effects of chitinases (tissue destruction as a consequence of inflammation and remodeling and, on the other hand, the protective role against apoptosis) should be taken into consideration when planning therapeutic interventions targeted at chitinases (application of potential chitinase inhibitors).

Chitinases and CLPs in Patients with COPD

The involvement of chitinases in human COPD seems ambiguous. There were studies showing that AMCase probably plays no role in both patients with COPD and healthy smokers. The level of this chitinase in BALF was below the ELISA detection threshold.²⁷ On the other hand, serum, induced sputum (IS) and BALF levels of CHIT1 and YKL-40, as well as the number of CHIT1 positive cells infiltrating the bronchial epithelium and submucosa, were significantly higher in smokers with COPD than in smokers without COPD or never smokers.^{27,61,62,94,95} It has been postulated that it could be related to higher macrophage and neutrophil CHIT1 and YKL-40 expression in COPD patients.^{27,36,96} Recent studies showed that the release of CHIT1 is stimulated by interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), lipopolysaccharide (LPS) as well as toll-like receptor (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-2 activation.⁹⁷⁻⁹⁹ The exposure of alveolar macrophages from smokers with

and without COPD to CHIT1 resulted in the production of IL-8, MMP-9 and MCP-1, cytokines said to be involved in tissue inflammation, alveolar destruction, and fibrosis.²⁷ Moreover, CHIT1 increases the activity of TGF- β signaling in fibroblasts (eg, through the induction of TGF- β receptor expression, inhibition of its feedback inhibitor – SMAD7 and interacting with a chaperone protein TGF- β receptor associate protein 1 (TGFRAP1) and forkhead box O3 (FOXO3)) resulting in enhanced production of extracellular connective tissue (eg, collagen), extracellular matrix protein (ECM) accumulation that may lead to alveolar destruction and tissue remodeling.^{100–102} Possible CHIT1-related signaling pathways are shown in Figure 2.^{27,36,95,97–102} It should be mentioned, however, that the exact role of CHIT1 in the pathogenesis of lung diseases is still highly hypothetical.

Similar pulmonary effect was demonstrated for YKL-40. Allergen and/or cigarette smoke (CS) exposure have been shown to trigger YKL-40 expression in several cell types (especially neutrophils, macrophages and epithelial cells).^{69,92,93,95,96} The induction of YKL-40 expression and secretion may be mediated by various mediators, including interleukin (IL)-1,-13,-17A,-18 and TNF α .^{65,69,95,104–106} YKL-40 induces the production of proinflammatory and profibrotic mediators, ultimately resulting in tissue inflammation, alveolar destruction and remodeling. This complex process involves different pathways, mechanisms and multiple stages of inflammatory and tissue reactions. These

include: 1) the activation and accumulation of dendritic cells (DC),⁶⁹ 2) significant increase of IL-8 production from bronchial epithelial cells (dependent on MAPK and NF- κ B pathway activation),⁸² 3) prevention of macrophage apoptosis and induction of alternative (M2) macrophage differentiation⁶⁹ with enhanced production of cytokines and chemokines, eg, IL-8, TGF β , MCP-1, MIP-1 α and MMP-9,⁹² 4) increased collagen production from lung fibroblasts (dependent on ERK and p-38 pathway activation).⁹⁶ Other inflammatory pathways may also play a role in modulation and aggravation of the YKL-40 response, eg, stimulation of TGF β production and its activation by IL-13,¹⁰³ as well as IL-8 mediated proliferation and migration of bronchial smooth muscle cells.⁸² The effects of YKL-40 on pulmonary structure and function are summarized in Figure 3.^{65,69,82,92,93,95,96,103–106}

Higher levels of CHIT1 and YKL-40 in serum and BALF of COPD patients correlated with a faster decline of lung function, the degree of airflow obstruction, the degree of diffusion lung capacity impairment, and frequency of exacerbations.^{27,94,96} The results of other studies also emphasized a positive correlation between high serum YKL-40 concentrations and the severity of COPD (measured as the rate of decline in lung function, lower arterial oxygen pressure and desaturation during the 6-min walk test).^{104,107} Gumus et al showed a relationship between serum levels of YKL-40 and the low-attenuation area percentage (LAA%) in chest computed tomography in COPD

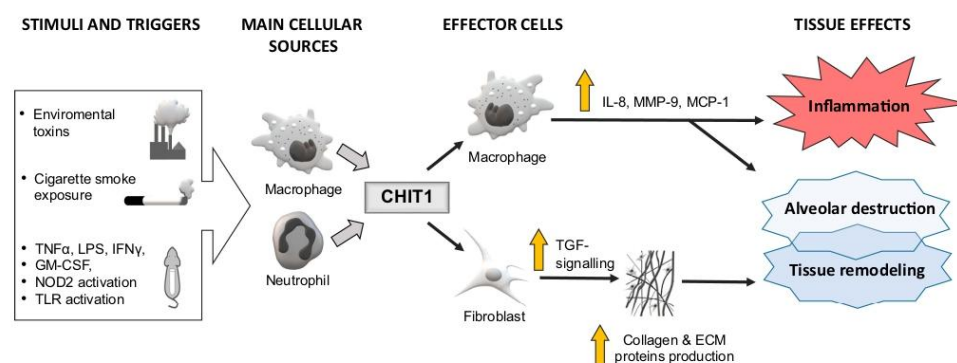


Figure 2 Schematic presentation of the hypothesized links between chitotriosidase (CHIT1) and the pathogenesis of lung inflammation and injury (eg, in COPD).

Notes: The exposure to cigarette smoke and other factors may enhance CHIT1 expression and increase its production, mainly by lung macrophages and neutrophils. The impact of CHIT1 on lung cells is heterogeneous and include inflammation and tissue destruction, mediated by interleukin 8 (IL-8), metalloproteinase 9 (MMP-9) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), as well as lung fibrosis induced by transforming growth factor-beta (TGF- β) pathway. However, the exact role of CHIT1 in the pathogenesis of lung diseases is still highly hypothetical. A large white arrow represents stimulation of macrophages and neutrophils by various factors, the thick grey arrows show the secretion of CHIT1 from the cellular sources, the thin black arrows depict the pathways of CHIT1 activity, the vertical yellow arrow represents the increase or enhancement.

patients, what may suggest the association between YKL-40 and development of emphysematous changes.¹⁰⁷ Interestingly, some studies suggest a protective role of CHIT1 against lung injury.^{108,109} Aminuddin et al found that smokers without a functional isoform of CHIT1 developed a faster rate of FEV₁ decline.¹⁰⁸ This may indicate that an active form CHIT1 may play a protective role against rapid COPD progression. In fact, the relationship between CHIT1 and COPD refers rather to more profound mechanisms of the disease than to exposure to cigarette smoke and polymeric chitin, only. This might be supported by the observations on no relationship between the levels of CHIT1 chitinolytic activity in BALF and serum with smoking history (measured in pack-years).^{60,98}

The possible protective role of chitinases in inflammation and lung injury may, at least partially, be related to anti-inflammatory effects of CHIT1 (mentioned earlier in the section on animal models of asthma).⁶⁸ CHIT1 inhibits allergen-stimulated Th2 cytokine production while enhancing the expression of the anti-inflammatory cytokines (TGF- β 1 and IL-10).⁶⁸ Moreover, CHIT1 enhances TGF- β 1-stimulated fibroblast proliferation and ECM accumulation in lungs.¹⁰⁰ An optimal level of CHIT1 seems to be both necessary and sufficient for

physiologic TGF- β 1-stimulated fibrotic ECM deposition and tissue repair responses. Nevertheless, the protective and favorable role of chitinases in inflammation and lung injury seems to be somewhat controversial and the data supporting this view are uncertain.

The Impact of Sex and Age on Chitinase and CLP Levels in Various Biological Samples

The activity of chitinases and their levels should also be discussed in the context of sex and ageing. Several studies documented a relationship between serum level of YKL-40 as well as CHIT1 and age. These findings refer to both patients with obstructive airway diseases (asthma and COPD) and healthy individuals.^{60,110,111} The increase in chitinase levels and activity in the elderly population could be associated with age-related comorbidities. It is also possible that the higher serum chitinase activity in older patients is associated with the accumulation of lipid-laden macrophages during the progression of age-related atherosclerosis.¹¹¹ In contrast to age, no differences between plasma YKL-40 levels in healthy men and women were found.¹¹⁰

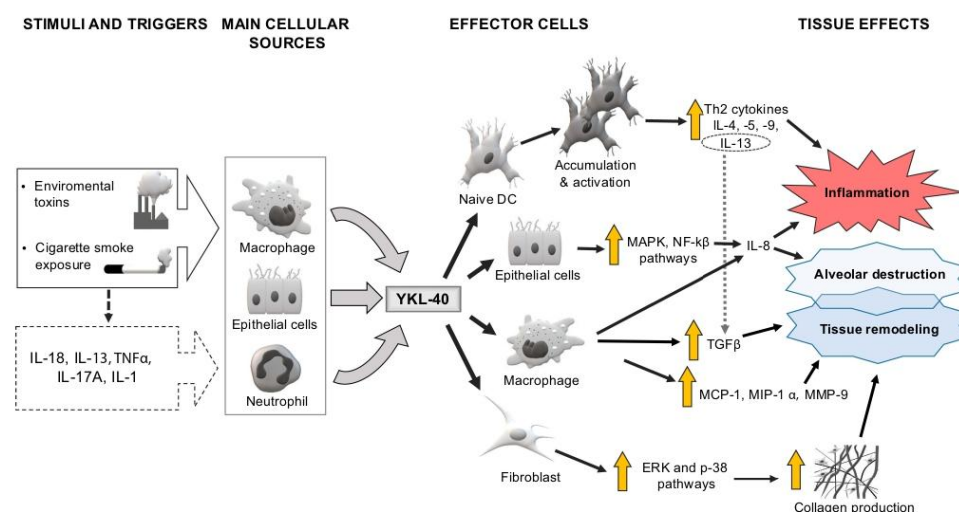


Figure 3 Schematic representation of the supposed mechanisms involved in YKL-40-related emphysematous lung destruction, tissue inflammation and remodeling. **Notes:** The large white arrow represents stimulation of macrophages, epithelial cells and neutrophils by various factors, the thin dashed black arrow depicts an indirect effect of environmental factors, the thick grey arrows show the secretion of YKL-40 from the cellular sources, the thin black arrows depict the possible YKL-40 signaling pathways, the thin dashed grey arrow depicts a stimulatory effect of interleukin 13 (IL-13) on transforming growth factor-beta (TGF β), the vertical yellow arrow represents the increase or enhancement. See manuscript text for more details.

The Polymorphisms of Chitinases/CLPs and the Course of Obstructive Airway Diseases

There were some studies aimed to evaluate whether the genetic variations of chitinase genes affect the course of obstructive diseases. Most of these studies analyzed the potential role of chitinase polymorphism (single-nucleotide polymorphisms – SNPs) in the expression of chitinase proteins and lung function.^{70,112,113} Some authors found that SNPs in AMCase and YKL-40 gene influence chitinase levels and have been associated with asthma status, atopy, IgE levels and impaired lung function.^{70,112,113} However, other studies showed no relationship between the polymorphism of chitinases and CLPs (AMCase, chitotriosidase and YKL-40) and asthma or allergy.^{71,114} One possible explanation for these discrepancies may be associated with differences in cohort characteristics included in various studies. It is possible that the influence of variation of these genes alone is weak and gene–environment interactions are essential to provoke allergic reactions. As mentioned previously, a 24-bp duplication in exon 10 in the CHIT1 gene results in producing a nonfunctional form of the protein.³⁶ This polymorphism has been associated with reduced chitinase activity in the lungs of smokers. The results of the analysis of genetic variations of CHIT1 and AMCase genes in large cohort groups are inconsistent. Aminuddin et al demonstrated that polymorphisms of CHIT1 and AMCase were associated with the baseline FEV₁ in a large cohort of COPD patients.¹⁰⁸ Moreover, there was a relationship between CHIT1 rs2494303 and AMCase G339T genotypes and a faster rate of lung function decline. Due to the differences in demographic factors characterizing different study cohorts (ie, the LHD group was statistically younger than the subjects in other cohorts), the authors suggested that chitinase polymorphism probably plays a role in lung development or early impairment of lung function but its influence in later stages of COPD (eg, as an effect of multiple factors that influence the course of the disease) cannot be easily estimated.

The Effect of Corticosteroids on Chitinase and CLP Levels

The impact of corticosteroids on the levels of chitinases and CLPs seems to be an important and interesting issue. This is not only because corticosteroids are commonly used to treat asthma and COPD but also because some

intriguing data on the influence of systemic corticosteroids on chitinase levels in patients with different diseases have been reported. As early as in 1999, Johansen et al reported that prednisolone therapy reduced serum YKL-40 levels in patients with rheumatoid arthritis.¹¹⁵ On the other hand, the BIOAIR study showed that two-week oral prednisone course (0.5 mg/kg body weight/day) added to regular treatment did not change serum YKL-40 levels and chitotriosidase activity in patients with asthma.⁶⁰ Surprisingly, the same therapeutic regimen in patients with COPD resulted in a reduction in serum chitotriosidase activity.⁶⁰ Moreover, an in vitro study by Kunz et al revealed that dexamethasone strongly inhibited the release of YKL-40 from the population of proinflammatory macrophages that are characterized by classic mechanism of activation, secretion of pro-inflammatory cytokines (eg, IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12) and promotion of Th1 immunity.¹¹⁶ However, long-term treatment with ICS (30 months) did not significantly change sputum and serum YKL-40 levels in patients with COPD.¹¹⁶ The lack of change in serum YKL-40 level may result from a low circulating corticosteroid level during ICS treatment.¹¹⁷ In addition, there are data suggesting that lung macrophages from patients with COPD have reduced corticosteroid sensitivity compared with macrophages from smokers without COPD.¹¹⁸ Thus, it seems essential to elucidate whether YKL-40 and other chitinase gene expressions are directly controlled by corticosteroids.

Perspectives

To date, chitinases and CLPs were mainly evaluated as chemical mediators or biomarkers involved in airway inflammation and fibrosis (as shown in Table 1). Some data presented in the paper point to their role not only in airway immunopathology, including chronic inflammation and tissue remodeling,^{27,30,119} but also in the clinical course of asthma and COPD, ie, severity of airway obstruction, rate of exacerbations and response to steroid treatment.^{60,61} It might be supposed that future studies will be focused not only on the role of chitinases and CLPs in airway diseases but also on chitinases as a therapeutic target. Studies on chitinase inhibitors showed that methylxanthines (theophylline, caffeine, and pentoxifylline) are not only competitive inhibitors of fungal family 18 chitinases but are also active against human chitinases.¹²⁰ It was also reported that another chitinase inhibitor – demethylallosamidin – reduces hyperresponsiveness (induced by IL-13) in OVA-induced asthma model and may have potential as a therapeutic

Table 1 Selected Information About Main Chitinases and Their Role in Humans

Type of Chitinase/CLP	Source	Known Stimuli Increasing Expression and Release	Known or Potential Conditions Associated with Abnormal Release	Role
Chitotriosidase (CHIT1)	Macrophages, neutrophils, epithelial cells	IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, TLR stimulation	Lysosomal storage diseases, neurodegenerative diseases (eg, Alzheimer's disease), acute infections (fungal and bacterial) chronic inflammation (eg, sarcoidosis), others (eg, non-alcoholic fatty liver disease)	Hydrolysis of chitin, transglycosylation activity, enhancement of immune response
AMCase	Lung epithelial cells, macrophages, eosinophils	IL-13, EGFR stimulation, TACE	Asthma, allergy	Hydrolysis of chitin, transglycosylation, Th2 inflammatory response, No chitinase activity, role in inflammation, tissue remodeling, and degradation
YKL-40	Chondrocytes, synovial cells, macrophages, fibroblasts, neutrophils, epithelial cells	IL-6, IFN- γ , AVP, PTHrP	Acute infections (eg, pneumonia), chronic inflammatory conditions (eg, asthma/allergy, COPD, sarcoidosis) cancers (eg, osteosarcoma, glioblastoma, breast cancer) others (eg, liver fibrosis, schizophrenia)	

Abbreviations: AVP, arginine-vasopressin; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DM2, diabetes mellitus type 2; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon-gamma; IL, interleukin; PTHrP, parathyroid hormone-related protein; TACE, TNF- α -converting enzyme; TLR, Toll-like receptor; TNF α , tumor necrosis factor α .

agent for asthma.¹²¹ The results of recent studies that evaluated the efficacy of AMCase and CHIT1 inhibitors in animal models of asthma seem to be promising.^{66,122} A better understanding of the physiological activity of chitinases and chitinase-like proteins could accelerate the future development of chitinase-specific therapeutic agents in obstructive lung diseases.

Acknowledgments

The authors thank Dr Marta Maskey-Warzechowska for her assistance in the preparation of the final version of the manuscript. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Disclosure

KG reports fees for lectures and travel expenses from Boehringer Ingelheim, Chiesi, AstraZeneca, Polpharma and Roche, outside the submitted work. RK reports personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, Chiesi, and AstraZeneca; and personal fees from Polpharma, outside the submitted work. The authors report no other conflicts of interest in this work.

References

- Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res*. 2005;49:93–135.
- Stern R. Go fly a chitin: the mystery of chitin and chitinases in vertebrate tissues. *Front Biosci Landmark Ed*. 2017;22:580–595. doi:10.2741/4504

- Sharp RG. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*. 2013;3(4):757–793. doi:10.3390/agronomy3040757
- Kato Y, Onishi H, Machida Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr Pharm Biotechnol*. 2003;4(5):303–309. doi:10.2174/1389201033489748
- Yang TL. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):1936–1963. doi:10.3390/ijms12031936
- Ziatabar S, Zepf J, Rich S, Danielson BT, Bollyky PI, Stern R. Chitin, chitinases, and chitin lectins: emerging roles in human pathophysiology. *Pathophysiology*. 2018;25(4):253–262. doi:10.1016/j.pathophys.2018.02.005
- Tang WJ, Fernandez J, Sohn JJ, Amemiya CT. Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr Biol CB*. 2015;25(7):897–900. doi:10.1016/j.cub.2015.01.058
- Weigel PH, Baggenstoss BA, Washburn JL. Hyaluronan synthase assembles hyaluronan on a [GlcNAc(β 1,4)]n-GlcNAc(α 1 $\rightarrow$)UDP primer and hyaluronan retains this residual chitin oligomer as a cap at the nonreducing end. *Glycobiology*. 2017;27(6):536–554. doi:10.1093/glycob/cwx012
- Lomiguen C, Vidal L, Kozłowski P, Prancan A, Stern R. Possible role of chitin-like proteins in the etiology of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;66(2):439–444. doi:10.3233/JAD-180326
- Patel S, Goyal A. Chitin and chitinase: role in pathogenicity, allergenicity and health. *Int J Biol Macromol*. 2017;97:331–338. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.042
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol*. 2007;27(1):21–28. doi:10.1080/07388550601168223
- Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG. Evolution of mammalian chitinase-like members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*. 2007;177(2):959–970. doi:10.1534/genetics.107.075846

13. Wiesner DL, Specht CA, Lee CK, et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):e1004701. doi:10.1371/journal.ppat.1004701
14. Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerd S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights.* 2007;2:128–146. doi:10.1177/117727190700200023
15. Chang NC, Hung SI, Hwa KY, et al. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem.* 2001;276(20):17497–17506. doi:10.1074/jbc.M010417200
16. Meng G, Zhao Y, Bai X, et al. Structure of human stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) reveals a saccharide-binding cleft with lower sugar-binding selectivity. *J Biol Chem.* 2010;285(51):39898–39904. doi:10.1074/jbc.M110.130781
17. Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem.* 1998;251(1–2):504–509. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510504.x
18. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:479–501. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142250
19. Tabata E, Kashimura A, Kikuchi A, et al. Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. *Sci Rep.* 2018;8(1):1461. doi:10.1038/s41598-018-19940-8
20. Uehara M, Tabata E, Ishii K, et al. Chitinase mRNA levels determined by QPCR in crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) tissues: species-specific expression of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase. *Genes.* 2018;9(5):244. doi:10.3390/genes9050244
21. Malaguamera L, Simporé J, Prodi DA, et al. A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes Immun.* 2003;4(8):570–574. doi:10.1038/sj.gene.6364025
22. Carroll RG. *Elsevier's Integrated Physiology*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007:99–115.
23. Tipton MJ, Harper A, Paton JFR, Costello JT. The human ventilatory response to stress: rate or depth? *J Physiol.* 2017;595(17):5729–5752. doi:10.1113/jp274596
24. Mack I, Hector A, Ballbach M, et al. The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. *Mol Cell Pediatr.* 2015;2(1):3. doi:10.1186/s40348-015-0014-6
25. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1288–1292. doi:10.1172/JCI117084
26. Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PA, Moorman AF, Aerts JM. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(10):1283–1292. doi:10.1369/jhc.4A6547.2005
27. Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, et al. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol.* 2010;176(2):638–649. doi:10.2353/ajpath.2010.090455
28. Kaneganti M, Kamba A, Mizoguchi E. Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *J Epithel Biol Pharmacol.* 2012;5:1–9. doi:10.2174/1875044301205010001
29. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem.* 2001;276(2):6770–6778. doi:10.1074/jbc.M009886200
30. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science.* 2004;304(5677):1678–1682. doi:10.1126/science.1095336
31. Wakita S, Kimura M, Kato N, et al. Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions. *Carbohydr Polym.* 2017;164:145–153. doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.095
32. Ramanathan M, Lee W-K, Lane AP. Increased expression of acidic mammalian chitinase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol.* 2006;20(3):330–335. doi:10.2500/ajr.2006.20.2869
33. Sutherland TE, Maizels RM, Allen JE. Chitinases and chitinase-like proteins: potential therapeutic targets for the treatment of T-helper type 2 allergies. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(7):943–955. doi:10.1111/cea.2009.39.issue-7
34. Homer RJ, Zhu Z, Cohn L, et al. Differential expression of chitinases identify subsets of murine airway epithelial cells in allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(3):L502–511. doi:10.1152/ajplung.00364.2005
35. Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, et al. CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21(10):1119–1126. doi:10.1097/MEG.0b013e328329742a
36. Seibold MA, Donnelly S, Solon M, et al. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):944–950. doi:10.1016/j.jaci.2008.08.023
37. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem.* 1993;268(34):25803–25810.
38. Rejman JJ, Hurley WL. Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;150(1):329–334. doi:10.1016/0006-291X(88)90524-4
39. Lian Z, De Luca P, Di Cristofano A. Gene expression analysis reveals a signature of estrogen receptor activation upon loss of Pten in a mouse model of endometrial cancer. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):255–266. doi:10.1002/(ISSN)1097-4652
40. Mohanty AK, Singh G, Paramasivam M, et al. Crystal structure of a novel regulatory 40-kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14451–14460. doi:10.1074/jbc.M208967200
41. Ringsholt M, EVS H, Johansen JS, Price PA, Christensen LH. YKL-40 protein expression in normal adult human tissues—an immunohistochemical study. *J Mol Histol.* 2007;38(1):33–43. doi:10.1007/s10735-006-9075-0
42. Nyirkos P, Golds EE. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *Biochem J.* 1990;269(1):265–268. doi:10.1042/bj2690265
43. Otsuka K, Matsumoto H, Niimi A, et al. Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2012;83(6):507–519.
44. Specjalski K, Chelmińska M, Jassem E. YKL-40 protein correlates with the phenotype of asthma. *Lung.* 2015;193(2):189–194. doi:10.1007/s00408-015-9693-y
45. Johansen JS, Jensen HS, Price PA. A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol.* 1993;32(11):949–955. doi:10.1093/rheumatology/32.11.949
46. Rathcke CN, Vestergaard H. YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Inflamm Res.* 2006;55(6):221–227.

47. Spoorenberg SMC, Vestjens SMT, Rijkers GT, et al. YKL-40, CCL18 and SP-D predict mortality in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respirol Carlton Vic*. 2017;22(3):542–550. doi:10.1111/resp.12924
48. Kzhyshkowska J, Yin S, Liu T, Riabov V, Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem*. 2016;397(3):231–247. doi:10.1515/hsz-2015-0269
49. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38(6):599–605. doi:10.1080/00365520310000537
50. Nøjgaard C, Johansen JS, Christensen E, et al. Serum levels of YKL-40 and PIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2003;39(2):179–186. doi:10.1016/S0168-8278(03)00184-3
51. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*; 2019.
52. Hekking P-PW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML, Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):896–902. doi:10.1016/j.jaci.2014.08.042
53. Larsson K, Ståhlberg B, Lisspers K, et al. Prevalence and management of severe asthma in primary care: an observational cohort study in Sweden (PACEHR). *Respir Res*. 2018;19(1):12. doi:10.1186/s12931-018-0719-x
54. Antonicelli L, Bucca C, Neri M, et al. Asthma severity and medical resource utilisation. *Eur Respir J*. 2004;23(5):723–729. doi:10.1183/09031936.04.00004904
55. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(5):650–658. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03929.x
56. Cartier A, Lehrer SB, Horth-Susin L, et al. Prevalence of crab asthma in crab plant workers in Newfoundland and Labrador. *Int J Circumpolar Health*. 2004;63(2):333–336. doi:10.3402/ijch.v63i0.17930
57. Tanaka H, Saikani T, Sugawara H, et al. Workplace-related chronic cough on a mushroom farm. *Chest*. 2002;122(3):1080–1085. doi:10.1378/chest.122.3.1080
58. Brinckmann BC, Bayat M, Brøgger T, Muttuvelu DV, Tjønneland A, Sigsgaard T. A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Ann Agric Environ Med*. 2011;18(1):7–12.
59. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838–848. doi:10.1038/nri2870
60. James AJ, Reinius LE, Verhoek M, et al. Increased YKL-40 and chitinase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(2):131–142. doi:10.1164/rccm.201504-0760OC
61. Konradsen JR, James A, Nordlund B, et al. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):328–335. doi:10.1016/j.jaci.2013.03.003
62. Lee JH, Park KH, Park JW, Hong CS. YKL-40 in induced sputum after allergen bronchial provocation in atopic asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(7):501–507.
63. Bara I, Ozier A, Girodet P-O, et al. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(7):715–722. doi:10.1164/rccm.201105-0915OC
64. Shen C-R, Juang H-H, Chen H-S, et al. The correlation between chitin and acidic mammalian chitinase in animal models of allergic asthma. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):27371–27377. doi:10.3390/ijms161126033
65. Nikota JK, Botelho FM, Bauer CM, et al. Differential expression and function of breast regression protein 39 (BRP-39) in murine models of subacute cigarette smoke exposure and allergic airway inflammation. *Respir Res*. 2011;12:39. doi:10.1186/1465-9921-12-39
66. Mazur M, Olczak J, Olejniczak S, et al. Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma. *J Med Chem*. 2018;61(3):695–710. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01051
67. Sutherland TE, Andersen OA, Betou M, et al. Analyzing airway inflammation with chemical biology: dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chem Biol*. 2011;18(5):569–579. doi:10.1016/j.chembiol.2011.02.017
68. Hong JY, Kim M, Sol IS, et al. Chitinase inhibits allergic asthmatic airways via regulation of TGF- β expression and Foxp3 + Treg cells. *Allergy*. 2018;73(8):1686–1699. doi:10.1111/all.2018.73.issue-8
69. Lee CG, Hartl D, Lee GR, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med*. 2009;206(5):1149–1166. doi:10.1084/jem.20081271
70. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, et al. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(12):1505–1509. doi:10.1164/rccm.200506-890OC
71. Bierbaum S, Superti-Furga A, Heinzmann A. Genetic polymorphisms of chitinase in Caucasian children with bronchial asthma. *Int J Immunogenet*. 2006;33(3):201–204. doi:10.1111/eji.2006.33.issue-3
72. Vicencio AG, Chupp GL, Tsirilakis K, et al. CHIT1 mutations: genetic risk factor for severe asthma with fungal sensitization? *Pediatrics*. 2010;126(4):e982–e985. doi:10.1542/peds.2010-0321
73. Goldman DL, Li X, Tsirilakis K, Andrade C, Casadevall A, Vicencio AG. Increased chitinase expression and fungal-specific antibodies in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(4):523–530. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03886.x
74. Santos CB, Davidson J, Covar RA, et al. The chitinase-like protein YKL-40 is not a useful biomarker for severe persistent asthma in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(3):263–266. doi:10.1016/j.anaai.2014.05.024
75. Lai T, Chen M, Deng Z, et al. YKL-40 is correlated with FEV1 and the asthma control test (ACT) in asthmatic patients: influence of treatment. *BMC Pulm Med*. 2015;15:1. doi:10.1186/1471-2466-15-1
76. Gomez JL, Yan X, Holm CT, et al. Characterisation of asthma subgroups associated with circulating YKL-40 levels. *Eur Respir J*. 2017;50(4):1700800. doi:10.1183/13993003.00800-2017
77. Saba M, Sharif MR, Akbari H, Nikouejad H, Ramazani Jolfaii M. YKL-40 in asthma and its correlation with different clinical parameters. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(4):271–277.
78. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2016–2027. doi:10.1056/NEJMoa073600
79. Ahangari F, Sood A, Ma B, et al. Chitinase 3-like-1 regulates both visceral fat accumulation and asthma-like Th2 inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(7):746–757. doi:10.1164/rccm.201405-0796OC
80. James A, Stenberg Hammar K, Reinius L, et al. A longitudinal assessment of circulating YKL-40 levels in preschool children with wheeze. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017;28(1):79–85. doi:10.1111/pai.2017.28.issue-1
81. Hinks TSC, Brown T, Lau LCK, et al. Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):61–75. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.020
82. Tang H, Sun Y, Shi Z, et al. YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *J Immunol*. 2013;190(1):438–446. doi:10.4049/jimmunol.1201827

83. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):9–16. doi:10.1164/ajrcm.161.1.9802048
84. Fukakusa M, Bergeron C, Tulic MK, et al. Corticosteroids decrease eosinophil and CC chemokine expression but increase neutrophil, IL-8, and IFN-gamma-inducible protein 10 expression in asthmatic airway mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):280–286. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.036
85. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity. *Trends Immunol*. 2017;38(12):942–954. doi:10.1016/j.it.2017.07.003
86. Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3):694–699. doi:10.1164/ajrcm.161.3.9911005
87. Tesse R, Fiore F, Sillecchia O, et al. Effects of inhaled corticosteroids on exhaled breath condensate (EBC) pH and cytokines levels in children with asthma and atopic dermatitis (AD). *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):S281. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1163
88. Okawa K, Ohno M, Kashimura A, et al. Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs. *Mol Biol Evol*. 2016;33(12):3183–3193. doi:10.1093/molbev/msw198
89. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2163–2196. doi:10.1016/S0140-6736(12)61729-2
90. World Health Organization. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016*. Geneva: World Health Organization; 2018.
91. Verweij PE, Kerremans JJ, Voss A, Meis JF. Fungal contamination of tobacco and Marijuana. *JAMA*. 2000;284(22):2875. doi:10.1001/jama.284.22.2869
92. Létuvé S, Kozhich A, Arouche N, et al. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol*. 2008;181(7):5167–5173. doi:10.4049/jimmunol.181.7.5167
93. Matsuura H, Hartl D, Kang M-J, et al. Role of breast regression protein-39 in the pathogenesis of cigarette smoke-induced inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(6):777–786. doi:10.1165/rcmb.2010-0081OC
94. Guerra S, Halonen M, Sherrill DL, et al. The relation of circulating YKL-40 to levels and decline of lung function in adult life. *Respir Med*. 2013;107(12):1923–1930. doi:10.1016/j.rmed.2013.07.013
95. Majewski S, Tworek D, Szewczyk K, et al. Overexpression of chitotriosidase and YKL-40 in peripheral blood and sputum of healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;14:1611–1631.
96. Lai T, Wu D, Chen M, et al. YKL-40 expression in chronic obstructive pulmonary disease: relation to acute exacerbations and airway remodeling. *Respir Res*. 2016;17:31. doi:10.1186/s12931-016-0338-3
97. van Eijk M, van Roomen CPAA, Renkema GH, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(11):1505–1512. doi:10.1093/intimm/dxh328
98. van Eijk M, Scheij SS, van Roomen CP, Speijer D, Boot RG, Aerts JM. TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase. *FEBS Lett*. 2007;581(28):5389–5395. doi:10.1016/j.febslet.2007.10.039
99. Malaguamera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(3):128–132. doi:10.1002/(ISSN)1098-2825
100. Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(1):14–21. doi:10.4168/aa.2015.7.1.14
101. Lee CM, He CH, Park JW, et al. Chitinase 1 regulates pulmonary fibrosis by modulating TGF-β/SMAD7 pathway via TGFBRAP1 and FOXO3. *Life Sci Alliance*. 2019;2(3):e201900350.
102. Lee CG, Herzog EL, Ahangari F, et al. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF-β1 signaling. *J Immunol*. 2012;189(5):2635–2644. doi:10.4049/jimmunol.1201115
103. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med*. 2001;194(6):809–821. doi:10.1084/jem.194.6.809
104. Sakazaki Y, Hoshino T, Takei S, et al. Overexpression of chitinase 3-like 1/YKL-40 in lung-specific IL-18-transgenic mice, smokers and COPD. *PLoS One*. 2011;6(9):e24177. doi:10.1371/journal.pone.0024177
105. Kang MJ, Yoon CM, Nam M, et al. Role of chitinase 3-Like-1 in Interleukin-18-induced pulmonary type 1, type 2, and type 17 inflammation; alveolar destruction; and airway fibrosis in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(6):863–871. doi:10.1165/rcmb.2014-0366OC
106. Kang MJ, Homer RJ, Gallo A, et al. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *J Immunol*. 2007;178(3):1948–1959. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1948
107. Gumus A, Kayhan S, Cinarka H, et al. High serum YKL-40 level in patients with COPD is related to hypoxemia and disease severity. *Tohoku J Exp Med*. 2013;29(2):163–170. doi:10.1620/tjem.229.163
108. Aminuddin F, Akhbar L, Stefanowicz D, et al. Genetic association between human chitinases and lung function in COPD. *Hum Genet*. 2012;131(7):1105–1114. doi:10.1007/s00439-011-1127-1
109. Cho SJ, Nolan A, Echevarria GC, et al. Chitotriosidase is a biomarker for the resistance to World Trade Center lung injury in New York City firefighters. *J Clin Immunol*. 2013;33(6):1134–1142. doi:10.1007/s10875-013-9913-2
110. Bojesen SE, Johansen JS, Nordestgaard BG. Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. *Clin Chim Acta*. 2011;412(9–10):709–712. doi:10.1016/j.cca.2011.01.022
111. Kurt I, Abasli D, Cihan M, et al. Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1100:185–188. doi:10.1196/annals.1395.017
112. Chatterjee R, Batra J, Das S, Sharma SK, Ghosh B. Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):202–208. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.030
113. Ober C, Tan Z, Sun Y, et al. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med*. 2008;358(16):1682–1691. doi:10.1056/NEJMoa0708801
114. Wu AC, Lasky-Su J, Rogers CA, Klanderman BJ, Litonjua A. Polymorphisms of chitinases are not associated with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):754–757. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.995
115. Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatol Oxf Engl*. 1999;38(7):618–626. doi:10.1093/rheumatology/38.7.618
116. Kunz LIZ, Van't Wout EFA, van Schadewijk A, et al. Regulation of YKL-40 expression by corticosteroids: effect on pro-inflammatory macrophages in vitro and its modulation in COPD in vivo. *Respir Res*. 2015;16:154. doi:10.1186/s12931-015-0314-3

117. Falcoz C, Oliver R, McDowall JE, Ventresca P, Bye A, Daley-Yates PT. Bioavailability of orally administered micronised fluticasone propionate. *Clin Pharmacokinet*. 2000;39(1):9–15. doi:10.2165/00003088-200039001-00002
118. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):24–31. doi:10.1164/rccm.200204-298OC
119. Agapov E, Battaile JT, Tidwell R, et al. Macrophage chitinase 1 stratifies chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(4):379–384. doi:10.1165/2009-0122R
120. Rao FV, Andersen OA, Vora KA, Demartino JA, van Aalten DM. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chem Biol*. 2005;12(9):973–980. doi:10.1016/j.chembiol.2005.07.009
121. Matsumoto T, Inoue H, Sato Y, et al. Demethylallosamidin, a chitinase inhibitor, suppresses airway inflammation and hyperresponsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(1):103–108. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.075
122. Mazur M, Bartoszewicz A, Dymek B, et al. Discovery of selective, orally bioavailable inhibitor of mouse chitotriosidase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(3):310–314. doi:10.1016/j.bmcl.2017.12.047

International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of COPD is an international, peer-reviewed journal of therapeutics and pharmacology focusing on concise rapid reporting of clinical studies and reviews in COPD. Special focus is given to the pathophysiological processes underlying the disease, intervention programs, patient focused education, and self management

protocols. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine and CAS. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/international-journal-of-chronic-obstructive-pulmonary-disease-journal>

Article

The Role of Chitinases in Chronic Airway Inflammation Associated with Tobacco Smoke Exposure

Natalia Przysucha ¹, Katarzyna Górka ^{1,*}, Marta Maskey-Warzechowska ¹, Małgorzata Proboszcz ¹, Patrycja Nejman-Gryz ¹, Magdalena Paplińska-Goryca ¹, Barbara Dymek ^{2,3}, Agnieszka Zagózdzon ³ and Rafał Krenke ¹

¹ Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

² Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

³ Molecure SA, 02-089 Warsaw, Poland

* Correspondence: katarzyna.gorska@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-599-2753



Citation: Przysucha, N.; Górka, K.; Maskey-Warzechowska, M.; Proboszcz, M.; Nejman-Gryz, P.; Paplińska-Goryca, M.; Dymek, B.; Zagózdzon, A.; Krenke, R. The Role of Chitinases in Chronic Airway Inflammation Associated with Tobacco Smoke Exposure. *Cells* **2022**, *11*, 3765. <https://doi.org/10.3390/cells11233765>

Academic Editor: Gergely L. Lukacs

Received: 19 September 2022

Accepted: 21 November 2022

Published: 25 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chitinases and chitinase-like proteins are thought to play a role in innate inflammatory responses. Our study aimed to assess whether chitinase concentration and activity in induced sputum (IS) of patients exposed to tobacco smoke are related to the level of airway inflammation including the level and activity of chitinases and chitinase-like proteins. The study included 22 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 12 non-COPD smokers, and nine nonsmoking subjects. Sputum CHIT1 and YKL-40 levels and chitinolytic activity were compared with sputum IL-6, IL-8, IL-18, and MMP-9 levels. A hierarchical cluster analysis was also performed. Sputum YKL-40 was higher in COPD patients than in the control groups. Sputum CHIT1 and YKL-40 levels correlated with IS inflammatory cell count as well as with MMP-9 and IL-8 levels. Two main clusters were revealed: Cluster 1 had lower chitinase levels and activity, lower IS macrophage and neutrophil count, and lower IS IL-8, IL-18, and MMP-9 than Cluster 2. Comparison of COPD patients from both clusters revealed significant differences in the IS inflammatory profile despite comparable clinical and functional data. Our findings seem to confirm the involvement of chitinases in smoking-associated chronic airway inflammation and show that airway chitinases may be a potential novel marker in COPD phenotyping.

Keywords: COPD; airway inflammation; chitinase; cytokines; YKL-40; CHIT1

1. Introduction

Chitinases, represented by chitotriosidase (CHIT1) and acid mammalian chitinase (AMCase), are a group of proteins involved in the innate immune response to chitin-containing organisms (i.e., parasites and fungi) [1,2]. They function by binding to chitin chains and hydrolyzing them to low molecular weight chitooligomers [3]. Chitinase-like proteins (CLPs) are a group of proteins which do not have hydrolytic activity but are still capable of binding chitin or chitin particles [3]. The most prominent CLP representative is chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), also known as YKL-40 [1]. An imbalance of chitinase activity has been reported in several inflammatory lung disorders, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and fibrosing lung diseases [1–5]. Recent studies are focused not only on the role of chitinases and CLPs in airway diseases but also on chitinases as a therapeutic target [6,7].

The primary cell sources of CHIT1 and YKL-40 in the lung are macrophages and neutrophils [8,9]. YKL-40 is also produced by epithelial cells [9]. Multiple triggers, including environmental toxins and tobacco smoke exposure, may enhance chitinase and CLP production [1]. It has been shown that CHIT1 and YKL-40 may simultaneously stimulate alveolar macrophages and epithelial cells to secrete proinflammatory and profibrotic mediators resulting in tissue inflammation, alveolar destruction, and tissue remodeling [1,5].

Smoking is known to be associated with an upregulation of chitinase gene expression and chitinase levels were found to be higher in smokers than those who had never smoked. This phenomenon was demonstrated not only in studies comparing patients with airway diseases with both smokers and non-smokers [8,10], but also in studies conducted in smoking and non-smoking patients affected by extrapulmonary disorders [11,12].

The role of chitinases in the pathogenesis of COPD is a relatively novel point of interest. With the growing evidence for their contribution to COPD-related inflammatory pathways and their potential application as a marker for smokers at risk of developing the disease [12,13], chitinases are a promising area of research. However, there is still little known about the mutual relationships between chitinases and other COPD inflammatory markers. Another understudied area is the role of chitinases and CLPs as potential novel treatment targets for COPD; considering that the efficacy of chitinase inhibitors is currently being investigated for the treatment of lung diseases in *in vitro* and animal models [14] and that therapeutic options in COPD are still limited and unsatisfactory in terms of effectiveness, targeting chitinases and CLPs is an attractive possible solution.

In the light of the above, we undertook a study aimed at assessing the levels and activity of CHIT1 and YKL-40 in induced sputum, as well as the mutual relationships between CHIT1/YKL-40 and various features of airway inflammation in patients with COPD, smokers without COPD, and people who have never smoked. Our working hypothesis, based on previously published data and our own results, was that chitinases/CLPs are not specifically related to COPD, but rather to the level of airway inflammation due to exposure to noxious factors, mainly those present in tobacco smoke. Thus, the specific aims were to: (1) compare chitinase concentration and activity in induced sputum (IS) in the investigated groups, (2) search for potential relationships between sputum chitinase concentration/activity and other inflammatory biomarkers, and (3) correlate chitinase concentration/activity with the clinical profiles of the investigated patients.

2. Materials and Methods

2.1. General Study Design and Participants

This prospective, observational study was performed by the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy of the Medical University of Warsaw between May 2018 and February 2019 and included mild-to-moderate COPD patients and controls who agreed to participate in the project. The ethics committee of the Medical University of Warsaw (KB/67/A/2018) approved the study. All participants signed an informed consent form before participating.

The scope of this study included: medical history, with particular attention given to signs and symptoms assessed using the modified Medical Research Council (mMRC) scale and the COPD Assessment Test (CAT), smoking and exacerbations history, physical examination, spirometry, and sputum induction.

2.2. Subjects

Forty-three subjects were enrolled, including 22 patients with COPD, 12 smokers without COPD, and 9 healthy nonsmokers. Inclusion criteria were as follows: (1) age above 40 years, and (2) diagnosis of COPD based on past medical history, data on noxious inhalants exposure, typical signs and symptoms, and irreversible airway obstruction identified by spirometry. We defined airway obstruction using a z-score of -1.645 (5th percentile) as the lower limit of normal [15] and divided COPD patients into four categories (A–D) depending on symptom severity and exacerbation history as recommended in the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2018 guidelines [16].

The inclusion criteria applied for the control groups (smokers and nonsmokers) comprised of: age above 40 years, a negative history of any chronic lung diseases, and an absence of respiratory symptoms and normal spirometry. Smokers were defined as individuals with 10 or more pack-years of smoking history. Patients who had previously smoked 10 or more pack-years but denied smoking one year before the study onset were defined

as ex-smokers. Patients with no smoking history (less than 1 pack-year) were classified as non-smokers.

Universal exclusion criteria for all subgroups included: symptoms of acute respiratory tract infection in the previous 6 weeks, oral and inhaled steroid treatment within 6 weeks preceding sample collection, active cancer disease, and any worsening of comorbidities (i.e., heart failure) within 6 weeks before the examination.

2.3. Spirometry

Spirometry testing was performed using a Lungtest 1000 spirometer (MES, Cracow, Poland) according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) guidelines [17]. Pre- and post-bronchodilator forced expiratory volume in the first second (FEV₁), forced vital capacity (FVC), and FEV₁/FVC% were measured in all COPD patients, while only baseline measurements were performed in control subjects (no bronchodilators administered).

2.4. Induced Sputum Collection and Processing

Sputum induction was preceded by inhalation of 400 µg of salbutamol. Next, inhalations of sterile hypertonic saline (NaCl) were applied at increasing concentrations (3, 4, and 5% solutions) via an ultrasonic nebulizer (ULTRA-NEBTM2000, DeVilbiss, Somerset, PA, USA), following ERS recommendations [18]. Induced sputum samples were processed as described elsewhere [19]. Sputum smears were used to assess total and differential leukocyte count. Induced sputum supernatants were stored at −80 °C and then used to measure cytokine concentrations, YKL-40 and CHIT1 levels, and chitinolytic activity.

2.5. Cytokine and Chitinase Concentration Measurements in IS

IL-6, IL-8, IL-18, MMP-9, YKL-40, and CHIT1 concentrations were measured using a standard quantitative sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique, strictly according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, and CircuLex Human ELISA Kit, MBL, Woburn, MA, USA). Each sample was evaluated twice. The IL-6 assay range was 3.1–300 pg/mL and the sensitivity was 0.7 pg/mL. For the IL-8, IL-18, and MMP-9 assays, the respective values for the assay range and sensitivity were as follows: 31.2–2.0 pg/mL and 7.5 pg/mL, 15.6–1.0 pg/mL and 5.15 pg/mL, and 0.3–20 ng/mL and 0.156 ng/mL. The human CHIT1 and YKL-40 detection ranges were 56.25–3600 pg/mL and 62.5–4000 pg/mL, respectively, and the sensitivity values were 48.3 pg/mL and 8.15 pg/mL, respectively.

2.6. Chitinolytic Activity Analysis

Chitinolytic activity was detected using the procedure described previously [20]. The concentrations of some substrates and volumes of analyzed samples were modified to adjust the procedure to human materials [6]. Substrate hydrolysis product 4-methylumbelliferone was measured fluorometrically using a Tecan Spark 10M microplate reader (Tecan, Switzerland) (excitation 355 nm/emission 460 nm). Chitinolytic activity in human samples was measured at pH 2 for the AMCase activity only and at pH 6 for both AMCase and CHIT1. Each sample was tested twice.

2.7. Statistical Analysis

Estimation of the sample size was based on data from an earlier study by Létuvé S et al. [21]. To detect between-group difference with a power of 80% and a significance level of 5%, the required sample size was estimated to be 42 subjects (21 COPD patients and 21 controls).

Statistical analysis was performed using Statistica 13.3 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) or R environment (version 4.0.5; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Data were presented as median and interquartile range (IQR) or percentage (%). Differences between groups were tested using a Pearson's chi-squared test for categorical variables, a Mann–Whitney U test for comparisons between two independent groups, or a

Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s post hoc test for multiple comparisons between groups. A *p*-value of less than 0.05 was accepted as indicating significance. Correlations between data were assessed using Spearman rank tests. Hierarchical clustering was performed on standardized data using Euclidean distance Ward D linkage. Outliers were normalized to mean $\pm$ 3SD (standard deviations). Logistic regression was performed using data prepared using the same method as for hierarchical clustering (i.e., standardized and outliers clipped).

3. Results

Basic comparative characteristics of the study participants are shown in Table 1.

Table 1. Basic characteristics of the investigated participants.

Clinical Data	Non-Smoking Control (<i>n</i> = 9)	Smoking Control (<i>n</i> = 12)	COPD (<i>n</i> = 22)	<i>p</i> -Value
Sex (Male/Female)	4/5	7/5	13/9	0.61
Age (years)	53 (45–69)	62 (59.5–67)	63.5 (61–75)	0.1
BMI (kg/m ²)	26.2 (24.7–30.1)	29 (26.5–32.4)	27.3 (23.5–31.1)	0.452
Smoking status (current smokers/ex-smokers)	n/a	9/3	12/10	0.47
Smoking history (pack-years)	0	30 (17.5–36.5)	45 (30–55)	0.005 *,&
Pre-bronchodilator FEV ₁ (% of predicted)	106 (83–115)	88 (83.5–94.5)	57.5 (49–62)	<0.001 *,&
Pre-bronchodilator FEV ₁ /FVC (%)	74.62 (67.2–77.6)	72.98 (71.2–79.2)	47.4 (43.1–54.9)	<0.001 *,&
Post-bronchodilator FEV ₁ (% of predicted)	n/a	n/a	64 (55–73)	n/a
Post-bronchodilator FEV ₁ /FVC (%)	n/a	n/a	51.38 (46–59.1)	n/a
GOLD A/B/C/D categories (n)	n/a	n/a	2/17/1/2	n/a
CAT score (points)	n/a	n/a	12 (8–17)	n/a
mMRC scale (points)	n/a	n/a	1 (1–2)	n/a

Abbreviations: BMI-body mass index; CAT-COPD Assessment Test; COPD-chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁-forced expiratory volume in first second; FVC-forced vital capacity; GOLD-Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; mMRC-modified Medical Research Council; n/a-not applicable. The significance for multiple comparisons is labeled as follows: * between COPD and smoking control, & between COPD and non-smoking control. Bolded values show statistical significance (*p* < 0.05).

Data on cellular composition/concentrations of cytokines, chitinases, and chitinolytic activity in IS are given in Table 2. Patients with COPD were characterized by the highest sputum IL-8 and YKL-40 levels (Table 2 and Figure 1). YKL-40 was undetectable in 75% of smoking controls, 33% of non-smoking controls, and only 14% of COPD patients. There were no differences in CHIT1 concentration and chitinolytic activity between the investigated groups (Table 2 and Figure 1). Chitinolytic activity was detected only at pH 6 and was highly correlated with sputum CHIT1 levels ($r = 0.71$, $p < 0.05$), suggesting that CHIT1 is the primary source of chitinolytic activity in the airways.

Using a logistic regression model with selected clinical and biochemical parameters that we created, we found that YKL-40 is an important inflammatory factor in COPD pathobiology (r -coefficient of 1.69 and *p*-value of 0.02) (Table 3).

Analysis of the entire investigated group revealed a significant negative correlation between IS YKL-40 and spirometry parameters (FEV₁% of predicted and FEV₁/FVC %, $r = -0.56$, $r = -0.66$, respectively, both $p < 0.0001$). Chitinase levels and activity in IS did not correlate with any other clinical features (Figure 2).

Table 2. Sputum parameters in study participants.

Parameters of Induced Sputum	Non-Smoking Control (n = 9)	Smoking Control (n = 12)	COPD (n = 22)	p-Value
Total cell count ($\times 10^6$ /g)	1.2 (0.7–2)	1.8 (1.4–2.2)	1.3 (0.7–2.5)	0.74
Macrophage cell count ($\times 10^6$ /g)	0.5 (0.3–0.8)	0.6 (0.5–0.8)	0.5 (0.21–0.9)	0.769
Macrophages (%)	46 (38–48)	39 (37–46.5)	35.5 (26–46)	0.395
Neutrophil cell count ($\times 10^6$ /g)	0.6 (0.3–1)	0.8 (0.6–1.2)	0.8 (0.4–1.2)	0.789
Neutrophils (%)	48 (40–50)	50.5 (40.5–58)	54.5 (45–68)	0.175
Lymphocyte cell count ($\times 10^6$ /g)	0.1 (0.1–0.1)	0.1 (0.1–0.2)	0.1 (0–0.1)	0.017 *
Lymphocytes (%)	5 (5–7)	7.5 (4–11)	3 (0–5)	0.107
Eosinophil cell count ($\times 10^6$ /g)	0.02 (0–0.04)	0.02 (0.02–0.05)	0 (0–0.02)	0.072
Eosinophils (%)	1 (1–2)	2 (1–4)	0.5 (0–1)	0.223
IL-6 (pg/mL)	1.8 (1.5–2.3)	3. (0.6–5.9)	0.8 (0.4–3.5)	0.217
IL-8 (pg/mL)	63.2 (44.1–111.7)	81.9 (51.5–95.4)	388.4 (149.8–500)	0.01 *,&
IL-18 (pg/mL)	27.1 (15–56.1)	14.2 (0–80.8)	60.5 (6.3–93.5)	0.361
MMP-9 (ng/mL)	66.8 (19.9–104.7)	144.4 (69.5–417.8)	258.4 (60.7–624.1)	0.175
CHIT1 (pg/mL)	238.5 (42.4–903.9)	1158.4 (135.8–5387.3)	961.8 (0–6669.1)	0.519
Chitinolytic activity (μ M/ μ L/h)	0.017 (0.01–0.02)	0.021 (0.013–0.086)	0.01 (0.003–0.05)	0.74
YKL-40 (pg/mL)	1422.3 (0–3550.8)	0 (0–1378.7)	16,407 (4738.3–42,193.3)	<0.001 *,&

Abbreviations: CHIT1-chitotriosidase; COPD-chronic obstructive pulmonary disease; IL-interleukin; MMP-9-matrix metalloproteinase 9; YKL-40-chitinase-3-like protein 1. Values are expressed as median and IQR. The significance for multiple comparisons is labeled as follows: * between COPD and smoking control, & between COPD and non-smoking control. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

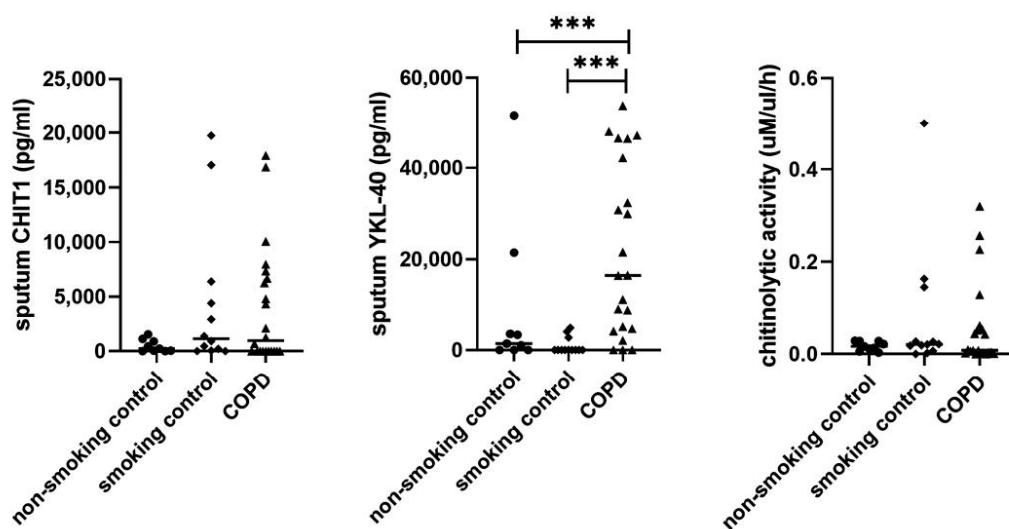


Figure 1. Induced sputum CHIT1 and YKL-40 concentrations and chitinolytic activity in COPD and control groups. Data are presented as median and individual values. Each data point represents a single individual categorized as follows: • represents cases from non-smoking control, ■ represents cases from smoking control and ▲ represents COPD cases. *** $p \leq 0.001$.

Table 3. A logistic regression model including selected clinical and sputum parameters identifying risk factors for COPD.

Clinical and Sputum Parameters	r-Coefficient	p-Value
(Intercept)	1.02	0.11
IL-8 (pg/mL)	0.66	0.38
Smoking history (pack-years)	5.23	0.01
CHIT1 (pg/mL)	0.20	0.80
YKL-40 (pg/mL)	1.69	0.02
IL-6 (pg/mL)	−0.26	0.67
Chitinolytic activity (uM/uL/h)	−0.97	0.35

Results are expressed as correlation coefficient (r) and p-value. Abbreviations: CHIT1-chitotriosidase; IL-interleukin; YKL-40-chitinase-3-like protein 1. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

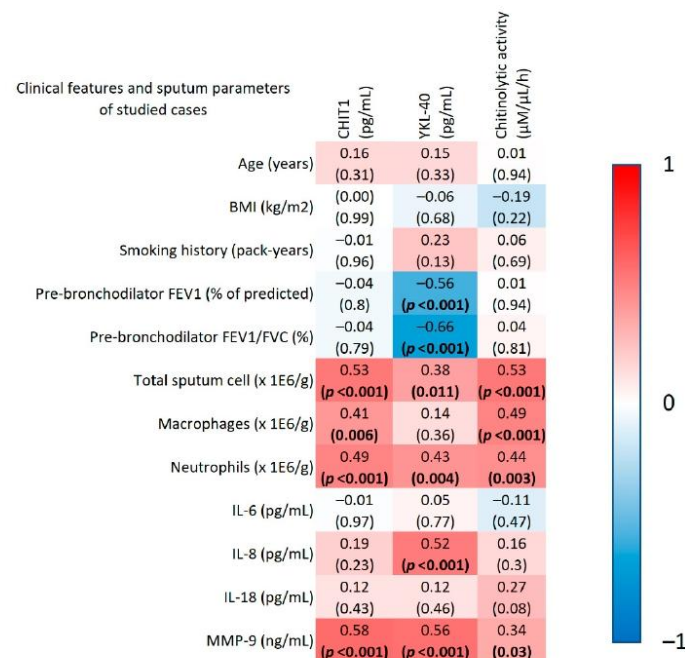


Figure 2. Correlation heatmap between selected clinical and sputum parameters and sputum chitinase levels in the entire study group (COPD patients and controls), expressed as correlation coefficient (r). The heatmap shows the correlation between clinical and sputum parameters (rows) and IS CHIT1 and YKL-40 levels and chitinolytic activity (columns). The colours of the heatmap correspond to the r-value (−1 to +1). The upper row in each square of the table denotes the r-value of the Spearman's rank correlation and the lower row denotes its p-value. Abbreviations: BMI-body mass index; CHIT1-chitotriosidase; FEV1-forced expiratory volume in the first second; FVC-forced vital capacity; IL-interleukin; MMP-9-matrix metalloproteinase 9; YKL-40-chitinase-3-like protein 1. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

A significant correlation between sputum CHIT1, YKL-40, and chitinolytic activity and both total cell count and the number of sputum neutrophils was found. Moreover, significant positive correlations were found between sputum macrophage counts, CHIT1 level, and chitinolytic activity. There were also positive correlations between IS MMP-9

and chitinase levels and chitinolytic activity, and between sputum IL-8 and YKL-40 levels (Figure 2).

A clustering analysis involving IS data from COPD patients and control groups was performed to discover any differences in the features of airway inflammation (Figure 3). Two main clusters were revealed; the clinical characteristics of both clusters are shown in Table 4.

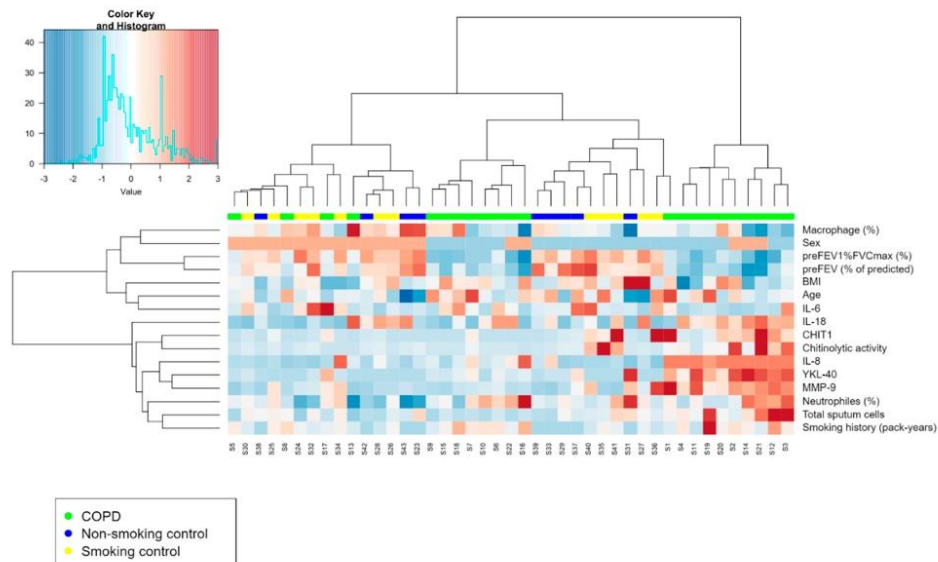


Figure 3. Hierarchical clustering heatmap of COPD patients and two control groups: non-smokers and smokers. The analysis included: clinical features, sputum cytokine concentrations, sputum chitinase levels and activity, and sputum cellular features. The vertical axis represents the study participants and the horizontal axis shows clinical and laboratory data. The colour scale represents the normalized value of a variable, with red representing the highest values.

Table 4. Clinical characteristics of patients in two identified clusters.

Clinical parameters	Cluster 1 (n = 34)	Cluster 2 (n = 9)	p-Value
COPD, n (%)	13 (38)	9 (100)	0.005
Control smokers, n (%)	12 (35)	0 (0)	<0.001
Control non-smokers, n (%)	9 (27)	0 (0)	<0.001
Male/female	17/17	6/3	0.37
Age (years)	62.5 (56–75)	62 (61–72)	0.85
BMI (kg/m ²)	27.9 (25.2–31.1)	24.8 (21.9–28.6)	0.17
Smoking history (pack-years)	26 (0–40)	45 (40–55)	0.03
Pre-bronchodilator FEV ₁ (l)	2.2 (1.7–3)	1.3 (1–1.8)	0.008
Pre-bronchodilator FEV ₁ (% of predicted)	89 (62–91)	50 (45–57)	<0.001
Pre-bronchodilator FEV ₁ /FVC (%)	68.5 (55.8–74.6)	46.3 (42.5–50.8)	<0.001

Abbreviations: BMI-body mass index; COPD-chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁-forced expiratory volume in first second; FVC-forced vital capacity. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

Cluster 1 included patients with COPD (38%), control smokers (35%), and non-smokers (27%) with a preserved gender balance. Cluster 2 included only patients with COPD (100%) and showed male predominance. There was no difference in age and BMI between the two clusters. Patients from Cluster 2 had worse lung function and greater tobacco smoke exposure (Table 4). This cluster also had a significantly higher proportion of total sputum cells and higher macrophage and neutrophil counts. Moreover, chitinase concentration (CHIT1 and YKL-40) and chitinase activity were significantly higher in Cluster 2 than in Cluster 1. The concentration of sputum cytokines IL-8, IL-18, and MMP-9 was elevated in Cluster 2, but the level of IL-6 was higher in Cluster 1 (Table 5).

Table 5. Cellular characteristics and the levels of sputum mediators in the two main identified clusters.

Parameters of Induced Sputum	Cluster 1 (<i>n</i> = 34)	Cluster 2 (<i>n</i> = 9)	<i>p</i> -Value
Total cell count ($\times 10^6$ /g)	1.2 (0.65–2.03)	2.82 (2.11–5.9)	<0.001
Neutrophils (%)	50.5 (45–59)	54 (45–71)	0.263
Neutrophils ($\times 10^6$ /g)	0.64 (0.33–0.98)	2.14 (0.97–3.56)	0.001
Macrophages (%)	40 (35–48)	32 (22–37)	0.04
Macrophages ($\times 10^6$ /g)	0.49 (0.27–0.79)	0.85 (0.67–1.95)	0.004
IL-6 (pg/mL)	1.98 (0.72–4.96)	0.46 (0.19–0.79)	0.02
IL-8 (pg/mL)	82.8 (57.76–167.95)	500 (500–500)	<0.001
IL-18 (pg/mL)	18 (0–62.25)	87.34 (68.79–93.47)	0.003
MMP-9 (ng/mL)	76.89 (26.73–193.1)	624.12 (426.7–647.01)	<0.001
CHIT1 (pg/mL)	135.76 (0–1553)	6669.08 (2119.33–7963.19)	0.002
Chitinolytic activity (μ M/ μ L/h)	0.013 (0.003–0.027)	0.06 (0.05–0.23)	0.001
YKL-40 (pg/mL)	1770.29 (0–5151.67)	46,429.17 (30,799.17–47,146.67)	<0.001

Abbreviations: CHIT1—chitinase; IL—interleukin; MMP-9—matrix metalloproteinase 9; YKL-40—chitinase-3-like protein 1. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

In the following step, we compared the clinical and biochemical profiles of patients with COPD from Clusters 1 and 2. No differences in sex distribution, age, BMI, smoking exposure, or exacerbation frequency and symptom severity (as reflected by mMRC and CAT scores) were found. There was no statistically significant difference in spirometry test results (Table 6).

Table 6. Clinical characteristics of COPD patients in the two identified clusters.

Clinical Data	COPD from Cluster 1 (<i>n</i> = 13)	COPD from Cluster 2 (<i>n</i> = 9)	<i>p</i> -Value
COPD, <i>n</i> (%)	13 (38)	9 (100)	0.35
Male/female (<i>n</i>)	7/6	6/3	0.64
Age (years)	68 (62–77)	62 (61–72)	0.35
BMI (kg/m^2)	27.9 (24.8–31.1)	24.8 (21.9–28.6)	0.3
Smoking history (pack-years)	45 (30–52.5)	45 (40–55)	0.815
Pre-bronchodilator FEV ₁ (l)	1.5 (1.17–1.9)	1.3 (1–1.8)	0.664
Pre-bronchodilator FEV ₁ (% of predicted)	61 (51–66)	50 (45–57)	0.082
Pre-bronchodilator FEV ₁ /FVC (%)	47.5 (44.8–56.7)	46.3 (42.5–50.8)	0.256
Post-bronchodilator FEV ₁ (l)	1.7 (1.4–2.1)	1.4 (1.3–2)	0.815
Post-bronchodilator FEV ₁ (% of predicted)	68 (58–73)	57 (51–64)	0.285
Post-bronchodilator FEV ₁ /FVC (%)	52.6 (47.5–59.1)	49.4 (44.4–51.2)	0.285

Abbreviations: BMI—body mass index; COPD—chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁—forced expiratory volume in first second; FVC—forced vital capacity. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

Patients with COPD from Cluster 2 were characterized by a significantly higher total IS cell count and a greater number of sputum neutrophils and macrophages. They also had higher levels of sputum IL-8, IL-18, and MMP-9 and higher chitinase levels and activity. Interestingly, the concentration of CHIT1 in sputum COPD patients from Cluster 1 was below the detection threshold (Table 7).

Table 7. Sputum cellular characteristics and mediator levels in COPD patients from the two identified clusters.

Parameters of Induced Sputum	COPD from Cluster 1 (<i>n</i> = 13)	COPD from Cluster 2 (<i>n</i> = 9)	<i>p</i> -Value
Total cell count ($\times 10^6$ /g)	0.8 (0.5–1.1)	2.8 (2.1–5.9)	<0.001
Neutrophils (%)	55 (49–62)	54 (45–71)	0.69
Neutrophils ($\times 10^6$ /g)	0.46 (0.26–0.69)	2.1 (1–3.6)	0.001
Macrophages (%)	40 (32–47)	32 (22–37)	0.22
Macrophages ($\times 10^6$ /g)	0.2 (0.2–0.4)	0.9 (0.7–2)	0.001
IL-6 (pg/mL)	2.9 (0.6–5)	0.5 (0.2–0.8)	0.07
IL-8 (pg/mL)	150.1 (72.8–271.9)	500 (500–500)	0.003
IL-18 (pg/mL)	7.2 (3.7–53.4)	87.34 (68.8–93.5)	0.019
MMP-9 (ng/mL)	81.2 (54.2–149.8)	624.1 (426.7–647)	0.001
CHIT1 (pg/mL)	0 (0–0)	6669.1 (2119.3–7963.2)	0.003
Chitinolytic activity (μ M/ μ L/h)	0.004 (0.001–0.01)	0.06 (0.05–0.23)	0.001
YKL-40 (pg/mL)	5151.7 (2118.3–11,130)	46,429.2 (30,799.2–47,146.7)	0.001

Abbreviations: CHIT1-chitotriosidase; COPD-chronic obstructive pulmonary disease; IL-interleukin; MMP-9-matrix metalloproteinase 9; YKL-40-chitinase-3-like protein 1. Bolded values show statistical significance ($p < 0.05$).

4. Discussion

Our study showed an interesting relationship between the level of airway inflammation due to chronic tobacco smoke exposure, expressed as the number of different inflammatory cells in IS, and both CHIT1 and YKL-40 levels and chitinolytic activity. This was demonstrated by a significant positive correlation between the sputum total cell, neutrophil, and macrophage counts and the levels of sputum YKL-40, CHIT-1, and chitinolytic activity in all the investigated groups. Moreover, our study revealed a significant positive correlation between the concentration of sputum MMP-9 and IL-8 and the levels of sputum CHIT1, YKL-40 levels, and CHIT1 activity. Sputum YKL-40 was significantly higher in patients with COPD than in both smoking and non-smoking controls, while CHIT1 and chitinolytic activity levels were comparable in the three investigated groups. A logistic regression model including a combination of clinical and biochemical variables confirmed that elevated IS YKL-40 level is a risk factor associated with COPD.

At the same time, cluster analysis showed that significant differences in chitinase concentration and activity among patients with COPD may occur. To our knowledge, hierarchical clustering analysis was not used in previous studies on chitinases in lung diseases and our study is the first to apply this approach. By demonstrating significant differences between the identified clusters, we confirmed different inflammatory patterns in the disease, supporting a potential role of precision medicine in COPD management.

Bearing in mind that macrophages, neutrophils, and epithelial cells are the main source of airway chitinases [8,9], the positive correlation between sputum cell count, neutrophils, and macrophages and chitinase levels and activity could be expected, however the existing data for COPD are not unequivocal. Otsuka et al. showed that sputum YKL-40 correlated with sputum neutrophils in both COPD and asthma and with sputum macrophages in COPD, although such an association was not found for controls [9]. In a study comparing

sputum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in which patients with COPD comprised one of the control groups, Guiot et al. demonstrated that sputum neutrophil count was significantly higher in patients with IPF and those with COPD compared to healthy controls, however, both sputum levels of YKL-40 and YKL-40 expression did not differ between the groups [22]. Majewski et al., who compared patients with COPD with smoking and non-smoking controls, found a higher sputum neutrophil and macrophage count in patients with COPD vs. non-smoking controls. This was also the case with sputum YKL-40 and both chitinase levels and chitinase expression, but not with the expression of YKL-40 [10]. It should be emphasized that our study is different than all previous studies on airway chitinase/CLPs levels in terms of the general approach. Namely, we were not focused on the chitinase and CLP levels in specific airway diseases but rather on their levels and activities in patients exposed to noxious gases and fumes that can induce and sustain airway inflammation. This was a consequence of our working hypothesis that the level of chitinases/CLPs in the airways is less associated with the specific disease, i.e., COPD, and more with the level of airway inflammation. As we found that participants with chronic airway inflammation (manifested by a higher number of total sputum cells, macrophages, and neutrophils) had significantly higher chitinase concentrations and activity, we believe our results can be construed as supporting this hypothesis. This observation also seems to align with the results of some earlier studies which suggest that CHIT1 and YKL-40 can be markers of inflammation associated with fibrosis and matrix remodeling in the lungs [8,22]. The lack of correlation between the level of cigarette smoking exposure and chitinase levels probably results from the complexity and diversity of airway inflammation. Tobacco smoke exposure is one of the numerous triggers and driving factors of airway inflammation. Moreover, the inflammatory effect of noxious gases and inhaled particles varies and depends on the individual susceptibility and characteristics of airway inflammatory responses.

Our analysis of chitinase and YKL-40 in the context of other sputum inflammatory markers showed a significant positive correlation between CHIT1, YKL-40, and chitinolytic activity and MMP-9 and a positive correlation between YKL-40 and IL-8. Furthermore, one of the two identified clusters characterized by elevated chitinase levels and chitinolytic activity also had significantly higher sputum MMP-9, IL-8, and IL-18 levels. These results are in line with earlier findings on the relationship between YKL-40, MMP-9, and IL-8. It has been documented that bronchial epithelial cells treated with YKL-40 show increased IL-8 production [23] and exposure of alveolar macrophages to YKL-40 or CHIT1 promoted the release of IL-8 and MMP-9 [8,22]. Our results confirm these observations.

Cluster analysis of the investigated subjects revealed some interesting findings. Two main clusters were identified. Cluster 1 comprised participants from all investigated groups (COPD, non-COPD smokers, and non-COPD non-smokers) and was characterized by lower sputum cell counts, lower inflammatory cytokine levels, and lower CHIT1, YKL-40, and chitinolytic activity in sputum. Cluster 2 was formed exclusively by patients with COPD and demonstrated more pronounced airway inflammation reflected by a higher sputum inflammatory cell count, higher cytokine concentrations, and higher CHIT1, YKL-40, and chitinase activity than Cluster 1. Interestingly, when only COPD patients from Cluster 1 and Cluster 2 were compared, both groups were comparable in terms of age, gender distribution, BMI, smoking history and pulmonary function, despite relevant differences in the sputum inflammatory profile as presented above. This supports the concept of treatable traits in obstructive lung diseases, highlighting the need to identify individual disease features in patients with similar clinical manifestations to tailor precise treatment. [24,25]. The extremely low values of CHIT1 and YKL-40 and reduced chitinolytic activity in COPD patients from Cluster 1 may be, at least partially, responsible for the lack of differences in chitinase levels/activity between the COPD group and controls.

One limitation of our study was the small COPD sample size used for cluster analysis. The COPD group was also too homogenous to reveal any significant differences in lung function and severity of the disease. Moreover, more prospective longitudinal studies

should be conducted to characterize COPD phenotypes and assess if these clusters influence the risk of exacerbation and the effectiveness of inhaled therapy. Although in the current study, the level of airway inflammation was attributed to only one factor, i.e., tobacco smoke exposure, we could have missed other crucial factors possibly contributing to the level of airway inflammation (e.g., working in a toxic environment, passive smoking).

Another significant limitation is that the elderly participants in our study had different comorbidities which could have affected our results. CHIT1 and YKL-40 are not specific to lung pathology and their levels can be elevated in multiple conditions, such as cardiovascular disease, cancer, inflammation, diabetes, and others [3]. Chitinase expression and activity may also be influenced by genetic polymorphism, although literature data on this matter are not uniform.

5. Conclusions

In conclusion, elevated IS YKL-40 levels in the COPD group and the relationship between some IS chitinases/CLPs (YKL-40) and some proinflammatory cytokines (IL-8 and MMP-9) suggest that chitinases may play an active role in chronic inflammation and tissue remodeling. Our study points to an association between the expression of chitinases and CLPs in the airways and the level of airway inflammation due to cigarette smoke exposure. However, this relationship seems to be ambiguous and needs further elucidation. Two main clusters were identified in the study. Cluster 2 included only COPD patients and was characterized by higher chitinase levels, chitinolytic activity, and more intense airway inflammation than Cluster 1. This difference should be considered when planning personalized treatments and precision medicine strategies for chronic airway diseases.

Author Contributions: Conceptualization, N.P., K.G., M.M.-W., P.N.-G., M.P.-G. and R.K.; Methodology, M.P., P.N.-G., M.P.-G. and A.Z.; Software, N.P. and P.N.-G.; Validation, P.N.-G., M.P.-G., B.D. and A.Z.; Formal analysis, N.P., K.G., P.N.-G., M.P.-G. and B.D.; Investigation, N.P., K.G., M.M.-W., M.P., P.N.-G., M.P.-G., B.D. and A.Z.; Resources, M.P., P.N.-G., M.P.-G. and B.D.; Data curation, N.P., K.G., M.P., P.N.-G., M.P.-G., B.D., A.Z. and R.K.; Writing—original draft, N.P.; Writing—review & editing, K.G., M.M.-W. and R.K.; Visualization, N.P. and M.P.-G.; Supervision, K.G. and R.K.; Project administration, N.P., P.N.-G. and B.D.; Funding acquisition, B.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the project “Development of a ‘first-in-class’ small molecule drug candidate for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis through chitotriosidase inhibition” (POIR.01.01.01-00-0551/15) and co-financed by the European Union through the European Regional Development Fund within the Smart Growth Operational Programme.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical University of Warsaw (KB/67/A/2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The reported data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: N.P., M.M.-W., M.P., P.N.-G., M.P.-G. declare no conflict of interest. R.K. reports a research grant from the National Science Centre, Poland, honoraria for lectures from Chiesi, AstraZeneca, Polpharma and MSD, fees for Advisory Board participation from MSD and AstraZeneca; all the above outside the submitted work. Boehringer Ingelheim, Chiesi, AstraZeneca and MSD have covered his fee and travel expenses for international conferences, outside the submitted work. K.G. reports a research grant from the National Science Centre, Poland, honoraria for lectures by Roche, AstraZeneca, Polpharma and Boehringer Ingelheim, support for attending meetings and travel by Roche and Boehringer Ingelheim and participation in Advisory Boards by Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. B.D. and A.Z. at the time of the study were employees and shareholders of Molecule SA (previously OncoArendi Therapeutics SA), which develops inhibitors of chitinases.

References

- Przysucha, N.; Górska, K.; Krenke, R. Chitinases and Chitinase-Like Proteins in Obstructive Lung Diseases—Current Concepts and Potential Applications. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2020**, *15*, 885–899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wiesner, D.L.; Specht, C.A.; Lee, C.K.; Smith, K.D.; Mukaremera, L.; Lee, S.T.; Lee, C.G.; Elias, J.A.; Nielsen, J.N.; Boulware, D.R.; et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004701. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kzhyshkowska, J.; Gratchev, A.; Goerd, S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark. Insights* **2007**, *2*, 128–146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Majewski, S.; Szewczyk, K.; Jerczyńska, H.; Miłkowska-Dymanowska, J.; Białas, A.J.; Gwadera, L.; Piotrowski, W.J. Longitudinal and Comparative Measures of Serum Chitotriosidase and YKL-40 in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 760776. [\[CrossRef\]](#)
- Chang, D.; Sharma, L.; Dela Cruz, C.S. Chitotriosidase: A marker and modulator of lung disease. *Eur. Respir. Rev.* **2020**, *29*, 190143. [\[CrossRef\]](#)
- Sklepikiewicz, P.; Dymek, B.A.; Mlacki, M.; Koralewski, R.; Mazur, M.; Nejman-Gryz, P.; Korur, S.; Zagodzón, A.; Rymaszewska, A.; von der Thüsen, J.H.; et al. Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *919*, 174792. [\[CrossRef\]](#)
- Dymek, B.; Sklepikiewicz, P.; Mlacki, M.; Güner, N.C.; Nejman-Gryz, P.; Drzewicka, K.; Przysucha, N.; Rymaszewska, A.; Paplińska-Goryca, M.; Zagodzón, A.; et al. Pharmacological Inhibition of Chitotriosidase (CHIT1) as a Novel Therapeutic Approach for Sarcoidosis. *J. Inflamm. Res.* **2022**, *15*, 5621–5634. [\[CrossRef\]](#)
- Létuvé, S.; Kozhich, A.; Humbles, A.; Brewah, Y.; Dombret, M.C.; Grandsaigne, M.; Adle, H.; Kolbeck, R.; Aubier, M.; Coyle, A.J.; et al. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 638–649. [\[CrossRef\]](#)
- Otsuka, K.; Matsumoto, H.; Niimi, A.; Muro, S.; Ito, I.; Takeda, T.; Terada, K.; Yamaguchi, M.; Matsuo, H.; Jinnai, M.; et al. Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* **2012**, *83*, 507–519. [\[CrossRef\]](#)
- Majewski, S.; Tworek, D.; Szewczyk, K.; Kiszalkiewicz, J.; Kurmanowska, Z.; Brzezińska-Lasota, E.; Jerczyńska, H.; Antczak, A.; Piotrowski, W.J.; Górski, P. Overexpression of chitotriosidase and YKL-40 in peripheral blood and sputum of healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2019**, *14*, 1611–1631. [\[CrossRef\]](#)
- Sanfilippo, C.; Longo, A.; Lazzara, F.; Cambria, D.; Distefano, G.; Palumbo, M.; Cantarella, A.; Malaguarnera, L.; Di Rosa, M. CHI3L1 and CHI3L2 overexpression in motor cortex and spinal cord of sALS patients. *Mol. Cell Neurosci.* **2017**, *85*, 162–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Logue, E.C.; Neff, C.P.; Mack, D.G.; Martin, A.K.; Fiorillo, S.; Lavelle, J.; Vandivier, R.W.; Campbell, T.B.; Palmer, B.E.; Fontenot, A.P. Upregulation of Chitinase 1 in Alveolar Macrophages of HIV-Infected Smokers. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1363–1372. [\[CrossRef\]](#)
- Guerra, S.; Halonen, M.; Sherrill, D.L.; Venker, C.; Spangenberg, A.; Carsin, A.E.; Tarès, L.; Lavi, I.; Barreiro, E.; Martínez-Moratalla, J.; et al. The relation of circulating YKL-40 to levels and decline of lung function in adult life. *Respir. Med.* **2013**, *107*, 1923–1930. [\[CrossRef\]](#)
- Mazur, M.; Dymek, B.; Koralewski, R.; Sklepikiewicz, P.; Olejniczak, S.; Mazurkiewicz, M.; Piotrowicz, M.; Salamon, M.; Jędrzejczak, K.; Zagodzón, A.; et al. Development of Dual Chitinase Inhibitors as Potential New Treatment for Respiratory System Diseases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7126–7145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Quanjer, P.H.; Stanojevic, S.; Cole, T.J.; Baur, X.; Hall, G.L.; Culver, B.H.; Enright, P.L.; Hankinson, J.L.; Ip, M.S.; Zheng, J.; et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: The global lung function 2012 equations. *Eur. Respir. J.* **2012**, *40*, 1324–1343. [\[CrossRef\]](#)
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. (Updated 2018). Available online: www.goldcopd.org (accessed on 17 July 2018).
- Miller, M.R.; Hankinson, J.A.T.S.; Brusasco, V.; Burgos, F.; Casaburi, R.; Coates, A.; Crapo, R.; Enright, P.; Van Der Grinten, C.P.M.; Gustafsson, P.; et al. Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.* **2005**, *26*, 319–338. [\[CrossRef\]](#)
- Djukanović, R.; Sterk, P.J.; Fahy, J.V.; Hargreave, F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur. Respir. J. Suppl.* **2002**, *37*, 1s–2s. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Górska, K.; Paplińska-Goryca, M.; Nejman-Gryz, P.; Goryca, K.; Krenke, R. Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD* **2017**, *14*, 181–189. [\[CrossRef\]](#)
- Mazur, M.; Olczak, J.; Olejniczak, S.; Koralewski, R.; Czeszkowski, W.; Jędrzejczak, A.; Golab, J.; Dzwonek, K.; Dymek, B.; Sklepikiewicz, P.L.; et al. Targeting Acidic Mammalian chitinase Is Effective in Animal Model of Asthma. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 695–710. [\[CrossRef\]](#)
- Létuvé, S.; Kozhich, A.; Arouche, N.; Grandsaigne, M.; Reed, J.; Dombret, M.C.; Kiener, P.A.; Aubier, M.; Coyle, A.J.; Pretolani, M. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 5167–5173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Guiot, J.; Henket, M.; Corhay, J.L.; Moermans, C.; Louis, R. Sputum biomarkers in IPF: Evidence for raised gene expression and protein level of IGFBP-2, IL-8 and MMP-7. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171344. [\[CrossRef\]](#)

23. Tang, H.; Sun, Y.; Shi, Z.; Huang, H.; Fang, Z.; Chen, J.; Xiu, Q.; Li, B. YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF- κ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 438–446. [[CrossRef](#)]
24. McDonald, V.M.; Fingleton, J.; Agusti, A.; Hiles, S.A.; Clark, V.L.; Holland, A.E.; Marks, G.B.; Bardin, P.P.; Beasley, R.; Pavord, I.D.; et al. Treatable traits: A new paradigm for 21st century management of chronic airway diseases: Treatable Traits Down Under International Workshop report. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1802058. [[CrossRef](#)]
25. Cardoso, J.; Ferreira, A.J.; Guimarães, M.; Oliveira, A.S.; Simão, P.; Sucena, M. Treatable Traits in COPD—A Proposed Approach. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2021**, *16*, 3167–3182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications

Natalia Przysucha^a, Magdalena Paplińska-Goryca^a, Katarzyna Górską^a,
Paulina Misiukiewicz-Stepień^a, Michał Młacki^c, Agata Cyran^b, Rafał Krenke^{a,*}

^a Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

^b Department of Pathology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

^c Molecule SA, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Tuberculosis
Tuberculous pleurisy
Pleural effusion
YKL-40
CHIT1
Chitinase

ABSTRACT

Background: Chitinases and chitinase-like proteins are implicated in the pathophysiology of lung diseases. This study aimed to evaluate the significance of chitotriosidase (CHIT1) and YKL-40 in tuberculous pleural effusion (TPE), identify their cellular sources, and assess their diagnostic potential as TPE biomarkers.

Methods: This observational, retrospective study included 66 patients with pleural effusion of different origins: malignant (MPE), tuberculous (TPE), parapneumonic (PPE), and transudative (TE). Pleural fluid levels of YKL-40 and CHIT1 were measured. Expressions of YKL-40 and CHIT1 in tuberculous pleural granulomas were also assessed using immunohistochemical staining.

Results: We found the highest median CHIT1 and YKL-40 levels for TPE: 70.51 (interquartile range [IQR] 49.65–136.98) ng/mL and 569.84 (IQR 530.32–706.01) ng/mL, respectively. YKL-40 was significantly higher in TPE than in PPE (387.98 [IQR 262.94–539.09] ng/mL, $p < 0.01$) and TE (254.95 [IQR 188.93–334.1] ng/mL, $p < 0.001$). There was a strong positive correlation between the YKL-40 level in TPE and the percentage of macrophages ($r = 0.73$, $p = 0.003$) and the adenosine deaminase activity ($r = 0.82$, $p < 0.001$). We revealed strong YKL-40 expression in tubercloid pleural granulomas.

Conclusion: YKL-40, but not CHIT-1, may contribute to the pleural inflammatory response associated with tuberculosis.

1. Introduction

Pleural effusion (PE) is a common manifestation of pleural diseases. It is estimated that as many as 360 per 100 000 patients present with PE each year. [1]. The most common causes of PE in Europe and the United States include heart failure (HF), malignancies, and pneumonia. Although tuberculosis (TB) ranks as the fourth most prevalent underlying disease globally [2,3], tuberculous pleural effusion (TPE) represents a substantial health challenge, particularly in regions with a high TB incidence, where it remains the leading cause of PE, accounting for up to 33 % of cases [4].

The primary diagnostic challenges associated with TPE involve the difficulty of confirming the diagnosis in populations with low TB prevalence and the challenge of excluding it in endemic areas with high TB prevalence. These problems stem from the limited sensitivity and negative predictive value of microbiological tests in detecting

Mycobacterium tuberculosis or its DNA in pleural fluid [5]. Considering these limitations various pleural fluid biomarkers have been tested to enhance the performance of TPE diagnosis [6]. Of these, adenosine deaminase (ADA) and interferon gamma (IFN- γ) have gained widespread acceptance and have been implemented in clinical practice [7]. Nonetheless, several other biomarkers have demonstrated comparable or slightly lower diagnostic performance than ADA and IFN- γ [8–11].

Considering the growing interest in the role of chitin and chitinases in the pathogenesis of human diseases, particularly their involvement in respiratory diseases, which are constantly exposed to infectious agents, we hypothesize that these factors may play a significant role in pulmonary tuberculosis and TPE [12,13]. Chitinases - chitotriosidase (CHIT1) and chitinase-like proteins (CLPs) including chitinase-3 like-protein 1, also known as YKL-40 - are bioactive compounds that contribute to modulate the human immune response [14–16]. They are a part of an innate immune response against chitin-containing microorganisms (i.e.,

* Corresponding author. Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Banacha 1A, 02-097 Warsaw, Poland.
E-mail address: rafal.krenke@wum.edu.pl (R. Krenke).

<https://doi.org/10.1016/j.tube.2025.102692>

Received 25 June 2025; Received in revised form 16 September 2025; Accepted 19 September 2025

Available online 19 September 2025

1472-9792/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Table 1
The basic comparative characteristics of patients with different causes of pleural effusion.

	TPE (n = 14)	MPE (n = 18)	PPE (n = 18)	TE (n = 16)	p-value
Sex [Male/Female]	(9/5)	(14/4)	(15/3)	(14/2)	0.44
Age [years]	57 (41–87)	72 (68–84)	70.5 (60–79)	80 (68.5–88)	0.13
Smoking history [pack-years]	0 (0–15)	0 (0–20)	0 (0–30)	0 (0–30)	0.76
ADA activity in PF [U/l]	91.9 (63.5–125.42)	15.5 (7.56–27)	22.2 (2.7–46.6)	5.4 (0–12.2)	<0.001 #&*
pH	7.33 (7.26–7.38)	7.40 (7.34–7.42)	7.35 (7.25–7.41)	7.41 (7.365–7.425)	0.01 *
Total PF pleural cell count [cell/μl]	1671 (1279–3756)	861 (373–1652)	1763 (784–2356)	204 (113–376)	<0.0001 *\$
macrophage [%]	3.5 (2–11)	5 (3.5–18)	10 (3–44)	17 (10–30)	0.53
neutrophils [%]	2.5 (1–6)	8.5 (2–19.5)	40 (10–62)	12 (4.5–19)	0.002 &
lymphocytes [%]	90 (75–95)	42 (18.5–89)	16.5 (1–47)	65 (35.5–70.5)	<0.001&*
eosinophils [%]	0 (0–1)	0.5 (0–2.5)	0 (0–1)	0 (0–2)	0.8
PF LDH activity [U/l]	514.5 (251–643)	217.5 (127–325)	356 (140–1525)	92.5 (70.5–114.5)	<0.001 **
Serum LDH activity [U/l]	183.5 (153–218)	228 (188–274)	159 (135–180)	193 (171–360)	0.015 #@
PF total protein [g/dl]	5.3 (4.5–5.4)	4.15 (3.2–4.8)	4.1 (2.8–5.1)	2.55 (1.75–3.45)	<0.0001 *\$
Serum total protein [g/dl]	6.85 (6.3–7.2)	6.7 (6.4–7.1)	6.0 (5.7–7.4)	6.55 (5.9–7.2)	0.69
PF glucose [mg/dl]	72 (67–104)	102 (87–118)	89 (77–101)	112 (103–144)	0.0005 *\$

Abbreviations: ADA-adenosine deaminase, CHIT1-chitotriosidase, LDH-lactate dehydrogenase, MPE-malignant pleural effusion, PF- pleural fluid, PPE-parapneumonic pleural effusion, TE-transudate, TPE-tuberculous pleural effusion, YKL-40 - chitinase- 3-like protein 1, WBC- white blood cells. The significance for multiple comparisons is labelled as follows: # between TPE and MPE, & between TPE and PPE, * between TPE and TE, \$ between PPE and TE, @ between MPE and PPE. The bolded values are statistically significant ($p < 0.05$) measured by Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test.

fungi and insects). CHIT1 and YKL-40 stimulate alveolar macrophages and epithelial cells to secrete proinflammatory and profibrotic mediators, resulting in tissue inflammation, alveolar destruction, and tissue remodeling [14,17]. To date, only the level of pleural fluid YKL-40 has been measured and only in the context of its diagnostic performance. However, the results have been inconsistent [18–22]: Javath Hussain et al. and Söyler et al. reported the highest median pleural fluid YKL-40 level in patients with malignant and paramalignant pleural effusion, respectively [18,19]. Therefore, YKL-40 was evaluated as the potential marker of malignant pleural effusion distinguishing MPE from nonMPE with relatively high sensitivity (83 %) and specificity (87 %) [18]. In contrast, Kim et al. found the highest pleural fluid YKL-40 levels in patients with tuberculous pleurisy [20], while Adamidi et al. did not detect significant differences in pleural fluid YKL-40 levels across effusions of different etiologies [21]. Drawing on our previous experience with chitinases in human pulmonary diseases, as well as biomarkers of TPE, we decided to conduct a more extensive study on chitinases in TPE. Specifically, we aimed (1) to assess the level of YKL-40 and CHIT1 in TPE versus non-TPE, (2) to identify the cellular sources of these proteins in pleural fluid, and (3) to calculate the diagnostic performance of CHIT1 and YKL-40 as potential biomarkers of TPE.

2. Materials and methods

2.1. General study design

This observational, cross-sectional, retrospective, single-center study included 66 patients with PE admitted to the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy of the Medical University of Warsaw between March 2020 and July 2022. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Medical University of Warsaw (AKBE/4/2024, January 08, 2024) and all participants gave written informed consent.

2.2. Patients

This hospital-based study included consecutive adult patients (>18 years) with PE in whom the underlying cause of PE had been established. All patients underwent diagnostic thoracentesis and pleural fluid analysis. An appropriate and individualized diagnostic approach was employed for each patient to identify the etiology of PE. The final analysis included patients with four common and well defined underlying causes of PE: malignant pleural effusion (MPE), TPE, parapneumonic pleural effusion (PPE), and transudative pleural effusion

(TE; see the “Definitions” section below). Patients were excluded if a significant number of fluid analyses were missing, if fluid samples were not preserved for YKL-40 and CHIT1 measurements, or if the underlying cause of PE was not determined.

2.3. Definitions

PE was classified as transudate or exudate based on Light’s criteria [23,24]. MPE was diagnosed when malignant cells were found in pleural fluid or pleural tissue samples; patients with known malignant disease who presented with unilateral PE and an alternative causes (e.g., pulmonary embolism or pneumonia) were excluded [2]. PPE was diagnosed in patients with the typical signs and symptoms (i.e. cough, acute febrile illness, and pleuritic pain), pulmonary consolidations on the chest radiograph, and no other explanation for PE [25]. At least one of the following criteria had to be met to diagnose TPE: (1) a positive culture for *M. tuberculosis* in pleural fluid, pleural biopsy specimen, or other respiratory samples (sputum, bronchial washing, or bronchoalveolar lavage fluid) and (2) granulomas in pleural biopsy samples in patients with no alternative explanation of their etiology [7,26].

2.4. Pleural fluid sample collection and analysis

Pleural fluid samples were collected during a diagnostic thoracentesis. The pleural fluid analysis included biochemical parameters (i.e., pH, the total protein and glucose concentrations, and the lactate dehydrogenase [LDH] activity), the total and differential cell counts, and microbiological and cytological examinations. Biochemical measurements were performed with an automated analyser (Vitros 5,1 FS; Johnson & Johnson, Langhorne, PA, USA). The pleural fluid ADA activity was determined by colorimetry according to a previously described method [27]. The pleural fluid samples intended for the measurement of CHIT1 and YKL-40 were centrifuged at 1800 rpm for 10 min at room temperature; the supernatant was frozen at -20°C until the assay.

Cell pellets were used for cytological examinations. Differential nucleated cell counts were assessed manually by counting 200 cells on a Papanicolaou-stained smear. The malignant cells were evaluated based on hematoxylin and eosin (H&E)-stained pleural fluid smears. The microbiological examination included pleural fluid Gram staining and cultures (both aerobic and anaerobic media). Pleural fluid samples for *M. tuberculosis* detection were centrifuged (4830 rpm for 15 min at 4°C), homogenized, and decontaminated using standard methods (4 % NaOH, 2.9 % sodium citrate, and 0.5 % N-acetyl-L-cysteine). Then, the samples

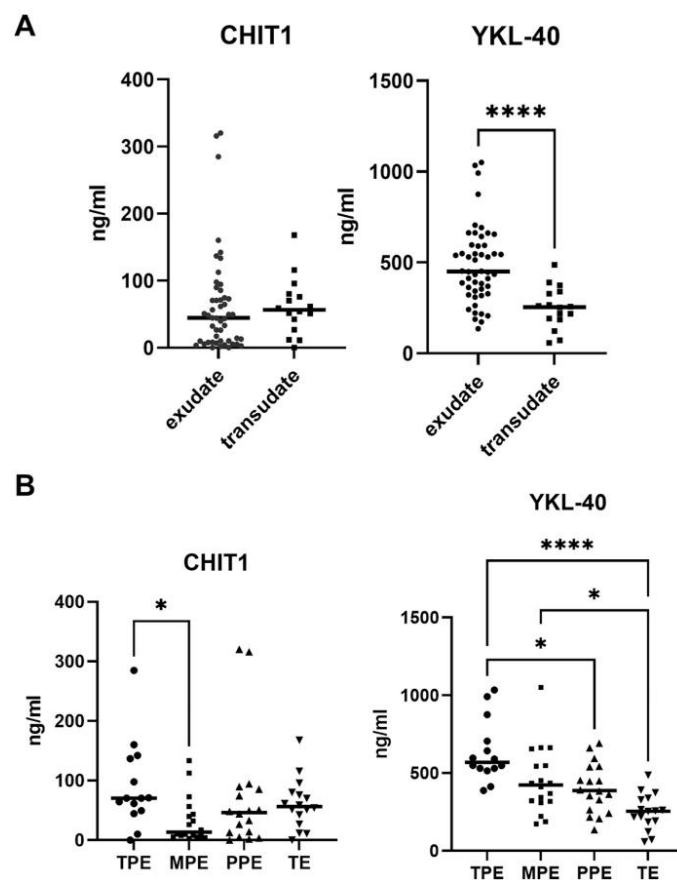


Fig. 1. CHIT1 and YKL-40 levels in exudates and transudates (A) and in groups with pleural effusion of different origins (B). Abbreviations: CHIT1-chitinase, MPE-malignant pleural effusion, PPE-parapneumonic pleural effusion, TE-transudate, TPE-tuberculous pleural effusion, YKL-40 – chitinase- 3-like protein 1. The figures present individual data points. * Statistical significance between studied groups was labelled as * p-value ≤ 0.05 ; ** p-value ≤ 0.01 ; **** p-value ≤ 0.001 .

were subjected to Ziehl-Neelsen staining for microscopy and inoculated on both solid medium (Löwenstein-Jensen) and liquid medium (Middelbrook 7H9) in an automated system (Bactec MIGIT, BD, USA). The samples were incubated at 37 °C for up to 8–10 weeks for solid medium and up to 6 weeks for liquid medium. In some patients, a genetic test for *M. tuberculosis* (Gene Expert Xpert MTB/RIF Cepheid, CA, USA) was also performed.

2.4.1. Measurement of the YKL-40 and CHIT1 concentrations in pleural fluid

The YKL-40 and CHIT1 concentrations were measured using a standard quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, strictly following the manufacturer's instructions (CircuLex Human ELISA Kit, MBL International, MA, USA). The human CHIT1 and YKL-40 detection ranges are 56.25–3600 and 62.5–4000 pg/mL, respectively, with a sensitivity of 48.3 and 8.15 pg/mL, respectively. All standards and samples were measured in duplicate.

2.5. Measurement of YKL-40 and CHIT1 expression in tuberculoid granulomas

Pleural biopsy specimens obtained by needle biopsy or medical thoracoscopy were fixed in 10 % neutral-buffered formalin. The tissue was submitted to immunohistochemical staining as described previously [28]. In brief, an anti-CHIT1 antibody (Biorbyt, orb377995; Lot# CQ2228, 1:200) and an anti-YKL-40/CHI3L1 antibody (Abcam, ab77528, lot# GR3196074-1, 1:50) were used, followed by a donkey anti-rabbit-horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152, Lot# 126333, 1:500). A 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen solution was used as the HRP substrate; a brown-coloured product indicated a positive signal. Counterstaining was performed with light hematoxylin (Gills 0.25 ×). The pathomorphological assessment of pleural granulomas was performed using light micrographs (Nikon Eclipse Ci).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 13.3 software

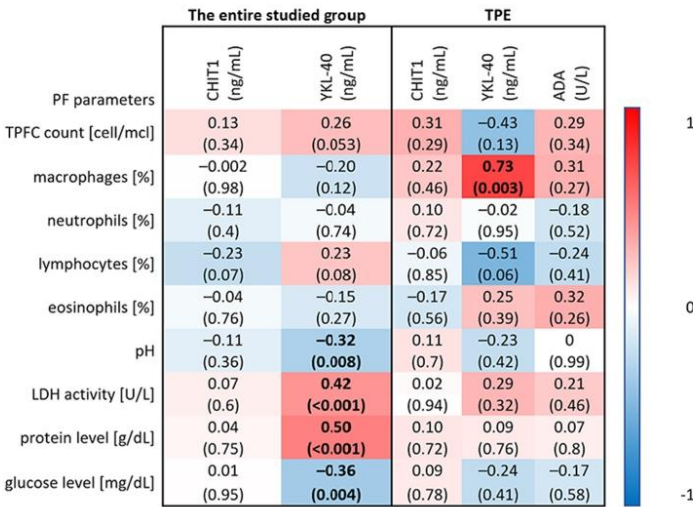


Fig. 2. Correlations heatmaps between pleural levels of CHIT1 and YKL-40 and selected fluid parameters in the entire studied group and between ADA, pleural levels of CHIT1 and YKL-40, and selected fluid parameters in TPE, expressed as correlation coefficient (r). The heatmap colour corresponds to the r-value (−1 to +1). The upper row in each table square denotes the r-value of the Spearman's rank correlation, and the lower row denotes its p-value. The bolded values are statistically significant (p < 0.05). Abbreviations: ADA-adenosine deaminase, CHIT1-chitotriosidase, LDH- lactate dehydrogenase activity, PF – pleural fluid, TPFC- total pleural fluid cell, YKL-40- chitinase-3-like protein 1.

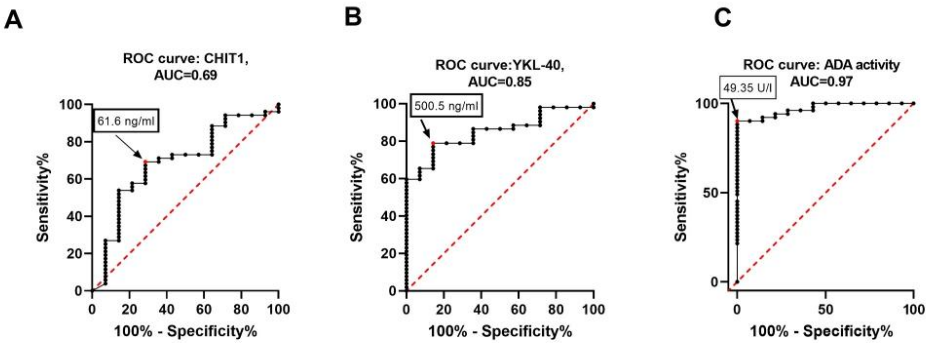


Fig. 3. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) for CHIT1 (A), YKL-40 (B) and ADA (C) as the biomarkers differentiating between TPE. Abbreviations: ADA-adenosine deaminase, AUC- area under the ROC curve, CHIT1-chitotriosidase, YKL-40 – chitinase- 3-like protein 1.

(StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and GraphPad (version 9.3.1 GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The data are presented as the median and interquartile range (IQR) or percentage (%). Differences between groups were tested using Pearson's chi-squared test (for categorical variables), the Mann-Whitney *U* test (to compare continuous variables between two independent groups), or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test (for multiple comparisons between groups). A p-value <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. Correlations were assessed with the Spearman rank test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed and the area under the curve (AUC), sensitivity, specificity, the positive predictive value (PPV), and the negative predictive value (NPV) were calculated to determine the best cut-offs for the CHIT1 of YKL-40 levels in pleural fluid. The logistic regression model was built for combined ADA (U/L) and YKL-40 (ng/mL) in TPE and non-TPE groups, a ROC curve

with AUC was constructed for this analysis.

3. Results

There were 14 patients with TPE, 18 with MPE, 18 with PPE and 16 with pleural transudates (mainly caused by heart failure, 13/16 (81 %) cases). The basic comparative characteristics of patients with various pleural fluid etiology are shown in Table 1. The primary tumor sites in patients with MPE were as follows: lung cancer (n = 6), pleural mesothelioma (n = 2), lymphoma (n = 2), colon cancer (n = 2), breast carcinoma (n = 1), cholangiocarcinoma (n = 1), gallbladder carcinoma (n = 1), and unknown origin (n = 2). There were no significant differences in age, sex, and smoking history between patients diagnosed with TPE, MPE, PPE, and pleural transudates. ADA activity was significantly higher in patients with TPE compared with the other forms of PE. The

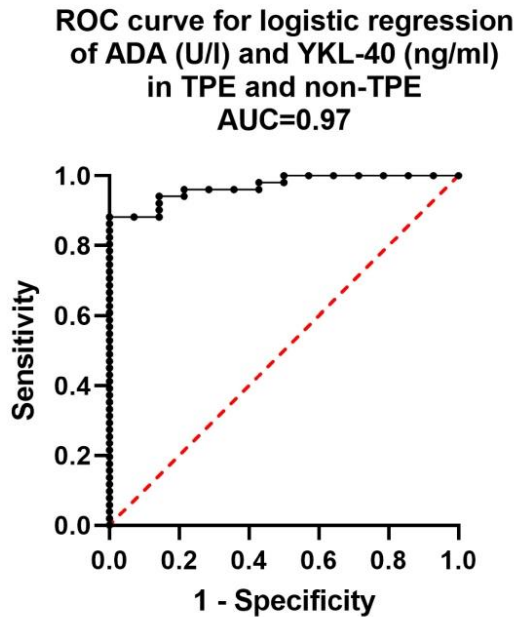


Fig. 4. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) for the combined model of ADA (U/l) and YKL-40 (ng/ml) as the biomarkers differentiating between TPE and non TPE. Abbreviations: ADA-adenosine deaminase, AUC-area under the ROC curve, TPE-tuberculous pleural effusion, YKL-40 – chitinase- 3-like protein 1.

highest prevalence of comorbidities was observed in the TE group, whereas the lowest was noted in the TPE group (see data below). The analysis further indicated that heart failure and type 2 diabetes were significantly more prevalent (detailed results are provided in [Supplementary Materials, Table 2](#)).

Fig. 1 shows the CHIT1 and YKL-40 levels in pleural fluid from the PE and TE groups. There was no significant difference in the median CHIT1 level between the groups (44.41 [IQR 3.87–139.62] ng/mL for PE vs. 56.49 [IQR 11.25–115.67] ng/mL for TE, $p = 0.32$). In contrast, the median YKL-40 level was significantly higher in the PE group (450.49 [IQR 219.29–698.74] ng/mL) compared with the TE group (254.95 [IQR 71.48–390.77] ng/mL, $p < 0.001$).

Fig. 1B presents the CHIT1 and YKL-40 levels in the three PE groups (TPE, MPE, and PPE) as well as the TE group. The TPE group had the highest median CHIT1 and YKL-40 levels (70.51 [IQR 49.65–136.98] ng/mL and 569.84 [IQR 530.32–706.01] ng/mL, respectively). In terms of CHIT1, the only significant difference was between the TPE group and the MPE group (13.66 [IQR 6.68–43.53] ng/mL, $p = 0.02$). Conversely, the YKL-40 level in the TPE group was significantly higher than in the PPE group (387.98 [IQR 262.94–539.09] ng/mL, $p < 0.01$) and the TE group (254.95 [IQR 188.93–334.1] ng/mL, $p < 0.001$), while there was no significant difference between the YKL-40 level between the TPE group and the MPE group (422.76 [IQR 318.72–547.96] ng/mL).

Correlation analysis for the entire study cohort showed a significant positive relationship between the YKL-40 pleural fluid level and the pleural fluid protein level and LDH activity ($r = 0.5$, $p < 0.001$, and $r = 0.42$, $p < 0.001$, respectively). The YKL-40 pleural fluid level correlated negatively with pleural fluid pH and the pleural fluid glucose level ($r = -0.32$, $p = 0.008$, and $r = -0.37$, $p = 0.004$, respectively). The detailed results are shown in [Fig. 2](#). In the TPE group, there was a strong positive

correlation between the YKL-40 pleural fluid level and the percentage of macrophages in pleural fluid ($r = 0.73$, $p = 0.003$). There was also a very strong positive correlation between the YKL-40 pleural fluid level and ADA activity ($r = 0.82$, $p < 0.001$ - the figure is available in the [Supplementary Materials](#)). [Fig. 2](#) shows the detailed correlation analysis for CHIT1 and YKL-40 in the TPE group.

The diagnostic performance of the YKL-40 pleural fluid level to differentiate between TPE and non-TPE yielded a sensitivity of 78.85 %, a specificity of 85.7 %, a PPV of 61.1 %, an NPV of 78.78 %, and an AUC of 0.85 (at a YKL-40 cut-off value of 500.5 ng/mL, [Fig. 3B](#)). The diagnostic performance of the CHIT1 pleural fluid level yielded a sensitivity of 69.2 %, a specificity of 64.3 %, a PPV of 37 %, and NPV of 89.7 %, and an AUC of 0.69 ([Fig. 3A](#)). By comparison, the pleural fluid ADA activity at a cut-off of 49.35 U/L yielded a sensitivity of 90.2 %, a specificity of 92.86 %, a PPV of 72.2 %, an NPV of 97.8 %, and an AUC of 0.97 ([Fig. 3C](#)). The combined model of ADA (U/l) and YKL-40 (ng/ml) did not improve differentiation between TPE and non-TPE groups compared to ADA (U/l) alone - the AUC of the ROCs remained virtually unchanged ([Fig. 4](#)).

Pleural biopsy specimens from six patients with TPE were available. Histopathological analysis revealed a distinct, clearly detectable YKL-40 signal in the cytoplasm of epithelioid cells and in multinucleated cells. On the other hand, CHIT1 staining was negligible ([Fig. 5](#)).

4. Discussion

Our study revealed detectable levels of CHIT1 and YKL-40 in pleural fluid from patients with PE caused by various underlying diseases. The highest pleural fluid levels of CHIT1 and YKL-40 were observed in patients with TPE. These results support the potential utility of CHIT1 and YKL-40 as biomarkers to distinguish between pleural effusion of different origins, with the caveat that moderate to reasonably sufficient diagnostic performance was observed for pleural fluid YKL-40, whereas the diagnostic performance of CHIT1 pleural fluid levels was distinctly lower. Although previous studies have explored chitinases and CLPs in PE, we believe that our results offer new insights. First, to the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the sources of YKL-40 from cellular components of TB pleural granulomas and comparing these results to negligible CHIT1 expression in TB granulomas. Second this is the first study conducted in the population from Central Europe with a low incidence of TB. Third, in contrast to other studies our patients with different underlying diseases did not differ significantly in terms of sex and age. Finally, we demonstrated distinct CHIT1 and YKL-40 profiles in patients with PE of various origins.

Our interest in chitinases as the bioactive compounds and potential biomarkers of TPE arose from previous studies on sarcoidosis. The observations of increased CHIT1 expression in macrophages localized within sarcoid granulomas [29], coupled with data from previous investigations on chitinases and PE [20,22,30], led us to posit that chitinases participate in TB pleural granuloma formation and pleural fluid accumulation. We are confident that our finding regarding the distinct expression profiles of CHIT1 and YKL-40 in TB pleural granulomas represents the most significant insight from our study. We demonstrated that in contrast to CHIT1, YKL-40 may be considered a reliable marker of TB pleural granulomas. Notably, its expression is most prominently evident in the cytoplasm of epithelioid and multinucleated cells. When juxtaposed with the results of prior research on the expression of CHIT1 and YKL-40 in sarcoid granulomas, which has shown positive expression of both proteins [29,30], we hypothesize that the expression of chitinases may become useful to differentiate between the etiology of granulomas. Necrotic granulomas are highly indicative of TB, but in some cases the differentiation between granulomatous disorders can be challenging [31]. Thus, our findings could offer valuable insights to distinguish clinically between these two disorders. It should be noted that the absence of CHIT1 expression within TB pleural granulomas may imply limited efficacy of CHIT1 inhibitors, in contrast to sarcoidosis

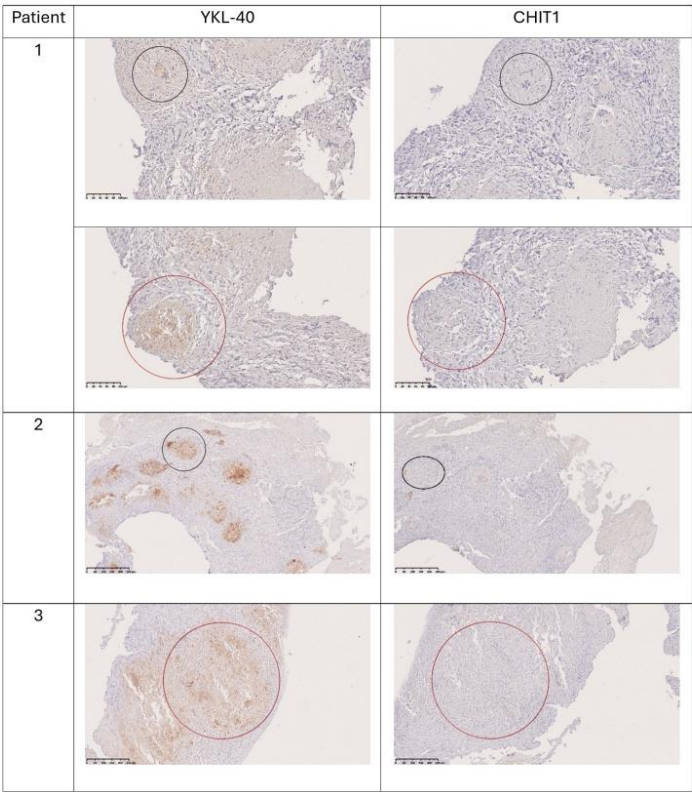


Fig. 5. Light micrograph of immunohistochemical staining for YKL-40 and CHIT1 in tuberculous granulomas from 3 selected patients. Magnification 20x (in samples from patient 1 and 2) and 10x (in samples from patient 3). Scale bar = 100 μ m. Black circle indicates epithelial multinucleated giant cells; red circle shows epithelioid cells. Abbreviations: CHIT1 - chitotriosidase, YK-40 - chitinase- 3-like protein 1.

[29].

Our results seem to align with earlier studies on TB, suggesting that chitinase could be involved in the immunopathogenesis of the disease. Lavalett et al. [32] described upregulated *CHIT1* gene expression in activated macrophages from patients with TB and indicated that this process could be implicated in the severity of the disease. Chen et al. [33] reported the reduction of plasma CHIT1 activity in patients during anti-TB treatment and its correlation with clinical parameters. However, our results suggest that YKL-40 may play a more significant role than CHIT-1 in the pathogenesis of pleural tuberculosis. If chitinases and CLPs have proinflammatory activity, then the positive correlation between YKL-40 and pleural fluid protein and LDH activity and negative correlation between YKL-40 and glucose pleural fluid levels and pH can be interpreted as reflecting an enhanced inflammatory response. These findings seem to be consistent with the results of earlier studies [19,20] and in line with observation that chitinolytic activity is significantly higher in patients with TPE compared with patients without TPE [34]. Summarizing the data on the proinflammatory role of chitinases and CLPs, it should be noted that although the true contribution of chitinases in lung pathobiology is still uncertain [14], the potential therapeutic effects of inhibition of chitinase activity has become the area of extensive research [28,29,35].

Our literature review indicates that relatively few studies have explored the role of chitinases and CLPs in pleural diseases, and that the

existing studies exhibit considerable diversity. Most authors have focused on analyzing YKL-40 levels in pleural fluid, while pleural fluid chitinase activity has been measured in only one study [18–22,34]. Kim et al. [21] reported that a YKL-40 pleural fluid level of 933 ng/mL can serve as the cut-off to differentiate between TPE and MPE, with a sensitivity of 74 %, specificity of 76 %, and an AUC of 0.78. We demonstrated even better diagnostic performance of YKL-40 pleural level (sensitivity 78.85 % and specificity 85.7 % at the cut-off level 500 ng/mL). Additionally, we noted that the CHIT1 pleural fluid level can be a relatively reliable marker differentiating between TPE and MPE. The above result is consistent with a previous study indicating that the pleural chitinase activity is higher in patients with TPE [34].

Another interesting finding of our study is a strong positive correlation between the YKL-40 level and ADA activity in the pleural fluid of patients with TPE. Previous analyses have revealed a significant correlation between chitinolytic and ADA activities and a strong correlation between the YKL-40 pleural/serum ratio and ADA activity [19,20,34]. However, the correlation between YKL-40 and ADA in TPE has not been reported. Given the observations suggesting a greater diagnostic value of ADA compared to YKL-40, it is unlikely that the latter will find application in diagnostic purposes. However, the clinical significance of chitinases appears to be primarily related to the analysis of their expression in histopathological samples. Our study suggests that tuberculous granulomas exhibit a characteristic chitinase expression pattern,

with the presence of YKL-40 and either absent or minimal expression of CHIT-1. The observed chitinase expression pattern may serve as a valuable biomarker in the differential diagnosis of granulomatous diseases. In our opinion, further evaluation of chitinase expression in other biological materials from patients with tuberculosis (e.g., bronchial mucosa, lung tissue samples) is necessary, as well as the assessment of histopathological samples in other granulomatous diseases.

Several limitations of our study must be acknowledged. First, we did not measure chitinolytic activity in PE and the chitinase level in the serum of the patients. In addition, we cannot rule out the possibility that other crucial factors, such as gene polymorphisms and comorbidities, may have contributed to the chitinase levels. However, we hope that the analysis of chitinase concentrations in pleural fluid correlates with pleural involvement, making the impact of comorbidities less significant. Second, our study was retrospective and conducted at a single center, involving a relatively small patient cohort, although it is comparable or even larger than in earlier studies. Therefore, the results should be validated in larger, multicenter, prospective studies. This is especially relevant for the findings related to CHIT1 and YKL-40 expression in patients with TB pleural granulomas, which were based on a limited number of pleural specimens. Third, while our approach to select groups that do not differ in terms of age and sex may be considered a strength, it can also be perceived as a limitation. Based on epidemiological data, it can be presumed that, in a real-world study, patients with TPE would typically represent a younger population compared with patients with MPE or PE due to heart failure.

5. Conclusions

YKL-40 may contribute to the pleural inflammatory response associated with TB whereas the role of CHIT-1 in this process seems to be considerably less pronounced. The study identified a specific pattern of YKL-40 and CHIT1 expression in TB granulomas and proved that epithelioid and multinucleated cells within these granulomas are the source of YKL-40 in pleural fluid. The YKL-40 level in pleural fluid demonstrates reasonably high diagnostic performance in distinguishing TPE from non-TPE and correlates with pleural fluid ADA activity.

CRediT authorship contribution statement

Natalia Przysucha: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Magdalena Paplińska-Goryca:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Katarzyna Górska:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Paulina Misiukiewicz-Stepień:** Methodology, Investigation. **Michał Młacki:** Methodology, Investigation. **Agata Cyran:** Methodology, Investigation. **Rafał Krenke:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Data curation, Conceptualization.

Ethics approval statement

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Medical University of Warsaw (AKBE/4/2024, January 08, 2024) and all participants gave written informed consent.

Conflict of interest

Dr. Krenke acknowledges receiving honoraria for lectures, participating in advisory board meetings, and receiving support for attending research conferences from MSD, Polska; AstraZeneca, Poland; Pfizer, Polska; and Bristol Myers Squibb, Polska; Michał Młacki is employee and shareholder of Molecure SA, which develops inhibitors of CHIT1. The other authors have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We acknowledge the patients and staff who have contributed to our research programme. Many thanks to Paulina Wójtowicz for dedication and participation in laboratory work. We would like to thank Michał Mierzejewski for assistance in collecting and organizing data.

Glossary

ADA	adenosine seaminase
AUC	area under ROC curve
CHIT1	chitotriosidase
CLPs	chitinase-like proteins
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HE	heart failure
H&E	hematoxylin and eosin
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleukin
LDH	lactate dehydrogenase
MPE	malignant pleural effusion
NPV	negative predictive value
PE	pleural effusion
PF	pleural fluid
PPE	parapneumonic pleural effusion
PPV	positive predictive value
ROC	Receiver-operating characteristic
TPE	tuberculous pleural effusion
TB	tuberculosis
TE	transudate
WBC	white blood cells
YKL-40	chitinase-3-like protein 1

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tube.2025.102692>.

References

- [1] Boddier U, Hallifax RJ. Epidemiology: why is pleural disease becoming more common? In: Maskell NA, Laursen CB, Lee YCG, et al., editors. *Pleural disease* (ERS monograph). Sheffield: European Respiratory Society; 2020. <https://doi.org/10.1183/2312508X.10022819>.
- [2] Light RW. *Pleural disease*. sixth ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- [3] Porcel JM, Esquerda A, Vives M, et al. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol* 2014;50:161–5. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.11.007>.
- [4] Khan FY, Alsamawi M, Yasin M, et al. Etiology of pleural effusion among adults in the State of Qatar: a 1-year hospital-based study. *East Mediterr Health J* 2011;17: 611–8.
- [5] Reddy SL, Varaprasad K, Narahari, et al. Clinical and etiological profile of an exudative pleural effusion in a tertiary care center. *Indian J Respir Care* 2019;8: 22–6. https://doi.org/10.4103/ijrc.ijrc_8_18.
- [6] Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2019;24:962–71. <https://doi.org/10.1111/resp.13673>.
- [7] Trajman A, Pai M, Dheda K, et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J* 2008;31:1098–106. <https://doi.org/10.1183/09031936.00147507>.
- [8] Krenke R, Korczynski P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:367–75. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32833a7154>.
- [9] Skouras VS, Kalomenidis I. Pleural fluid tests to diagnose tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2016;22:367–77. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000277>.
- [10] Valdés L, San José E, Ferreira L, et al. Interleukin 27 could be useful in the diagnosis of tuberculous pleural effusions. *Respir Care* 2014;59:399–405. <https://doi.org/10.4187/respcare.02749>.
- [11] Wang W, Zhou Q, Zhai K, et al. Diagnostic accuracy of interleukin 27 for tuberculous pleural effusion: two prospective studies and one meta-analysis. *Thorax* 2018;73:240–7. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209718>.
- [12] Lee SY, Lee CM, Ma B, et al. Targeting chitinase 1 and chitinase 3-Like 1 as novel therapeutic strategy of pulmonary fibrosis. *Front Pharmacol* 2022;13:826471. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.826471>.

- [13] Declercq J, Hammad H, Lambrecht BN, et al. Chitinases and chitinase-like proteins in asthma. *Semin Immunol* 2023;67:101759. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101759>.
- [14] Przysucha N, Górka K, Krenke R. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis* 2020;15:885–99. <https://doi.org/10.2147/COPD.S236640>.
- [15] Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerd S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights* 2007;2: 128–46. <https://doi.org/10.1177/117727190700200023>.
- [16] Przysucha N, Górka K, Maskey-Warzechowska M, Proboszcz M, et al. The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure. *Cells* 2022;11:3765. <https://doi.org/10.3390/cells11233765>.
- [17] Wiesner DL, Specht CA, Lee CK, et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004701. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004701>.
- [18] Javath Hussain S, Selvaraj J, Mohanty Mohapatra M, et al. Clinical utility of pleural fluid YKL-40 as a marker of malignant pleural effusion. *Curr Probl Cancer* 2019;43: 354–62. <https://doi.org/10.1016/j.cuprob.2018.10.001>.
- [19] Söyler Y, Kayacan O, Taner A. Levels of YKL-40 in pleural effusion and blood from patients with pleuritis. *Tuberk Toraks* 2020;68:268–77. <https://doi.org/10.5578/tt.70090>.
- [20] Kayhan S, Gumus A, Cinarka H, et al. The clinical utility of pleural YKL-40 levels in diagnosing pleural effusions. *J Thorac Dis* 2013;5:634–40. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.19>.
- [21] Kim HR, Jun CD, Lee KS, Cho JH, et al. Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease. *Cytokine* 2012;58:336–43. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.001>.
- [22] Adamidi T, Soultzis N, Neofytou E, et al. Expression of YKL-40 and MIP-1a proteins in exudates and transudates: biomarkers for differential diagnosis of pleural effusions? A pilot study. *BMC Pulm Med* 2015;15:150. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0144-6>.
- [23] Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, et al. Pleural effusions: the diagnostic separations of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77:507–13.
- [24] Porcel JM, Vives M, Vicente de Vera MC, et al. Useful tests on pleural fluid that Distinguish transudates from exudates. *Ann Clin Biochem* 2001;38:671–5. <https://doi.org/10.1258/0004563011901082>.
- [25] Hamur H, Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur Respir J* 1997;10: 1150–6. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10051150>.
- [26] Valdés L, Pose A, San José E, et al. Tuberculous pleural effusions. *Eur J Intern Med* 2003;14:77–88. [https://doi.org/10.1016/S0953-6205\(03\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0953-6205(03)00018-9).
- [27] Gusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. second ed. New York: Academic Press; 1974. p. 1092–9.
- [28] Sklepiewicz P, Dymek B, Mlacki M, et al. Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2022;15 (919):174792. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174792>.
- [29] Dymek B, Sklepiewicz P, Mlacki M, Güner NC, et al. Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis. *J Inflamm Res* 2022;15:5621–34. <https://doi.org/10.2147/JIR.S378357>.
- [30] Johansen JS, Milman N, Hansen M, et al. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis—a potential marker of disease activity? *Respir Med* 2005;99: 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.09.016>.
- [31] Patterson KC, Queval CJ, Gutierrez MG. Granulomatous inflammation in tuberculosis and sarcoidosis: does the lymphatic system contribute to disease? *Bioessays* 2019;41:e1900086. <https://doi.org/10.1002/bies.201900086>.
- [32] Lavalet L, Rodriguez H, Ortega H, Sadee W, et al. Alveolar macrophages from tuberculosis patients display an altered inflammatory gene expression profile. *Tuberculosis* 2017;107:156–67. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.08.012>.
- [33] Chen M, Deng J, Li W, et al. The relationship between chitotriosidase activity and tuberculosis. *Epidemiol Infect* 2015;143:3196–202. <https://doi.org/10.1017/S095026881500062X>.
- [34] Bouzas L, San José E, Tutor JC. Chitotriosidase activity in pleural effusions. *Clin Lab* 2007;53:449–52.
- [35] Choi YJ, Han H, Lee JH, et al. Particulate matter10-induced airway inflammation and fibrosis can be regulated by chitinase-1 suppression. *Respir Res* 2023;24:85. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02392-8>.

7. Podsumowanie i omówienie uzyskanych wyników

W pracy pt. *Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications* przeprowadzono szeroką analizę dostępnego piśmiennictwa, podsumowując dotychczasową wiedzę o potencjalnej roli chitynaz w chorobach obturacyjnych układu oddechowego. Aby zaprezentować pełne spektrum dostępnych danych w analizie uwzględniono 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 chitynazę 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- tj. wiek, płeć, steroidoterapię czy polimorfizm białek.

Potencjalna rola chitynaz w patofizjologii astmy była oceniana szczególnie w kontekście oceny stężeń i aktywności CHIT1 oraz YKL-40. Liczne badania wskazują, że ich podwyższone stężenia w surowicy i plwocinie są związane z nasileniem objawów, stopniem obturacji dróg oddechowych, ryzykiem zaostrzeń oraz gorszą kontrolą astmy [28,33,56-58]. Wysokie stężenia YKL-40 są szczególnie charakterystyczne dla ciężkiej, słabo odpowiadającej na leczenie astmy, wiążą się z częstszymi hospitalizacjami, większym zapotrzebowaniem na glikokortykosteroidy oraz nasilonym remodelingiem dróg oddechowych [58]. Zależność YKL-40 od neutrofilowego profilu zapalenia oraz jego zdolność do indukowania Il-8 i proliferacji mięśni gładkich oskrzeli, sugerują możliwy udział tej cząsteczki w patogenezie neutrofilowej, steroidoopornej postaci astmy [35,56]. Natomiast znaczenie AMCase w astmie człowieka pozostaje niejasne, gdyż mimo jej ekspresji w płucach, wykazuje ona znikomą lub żadną aktywność biologiczną, co podważa jej bezpośredni udział w patofizjologii choroby [11,12].

Dane dotyczące udziału chitynaz w patogenezie POChP są niejednoznaczne. Wyniki wielu badań pokazują, że stężenia YKL-40 i CHIT1 w surowicy, plwocinie indukowanej i płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego są istotnie podwyższone u chorych na POChP w porównaniu z palaczami bez POChP i osobami nigdy niepalącymi [35,37,38]. Podwyższona ekspresja tych cząsteczek, głównie w makrofagach i neutrofilach, sprzyja nasileniu zapalenia, destrukcji pęcherzyków i remodelingowi płuc

poprzez indukcję mediatorów prozapalnych i profibrotycznych, takich jak IL-8, MMP-9, MCP-1 czy TGF- β [37,40,59]. Podwyższone stężenia CHIT1 i YKL-40 związane są z gwałtowniejszym spadkiem czynności płuc i jednoczesnym nasileniem stopnia obturacji, upośledzeniem dyfuzji oraz zwiększoną częstością zaostrzeń POChP, a YKL-40 dodatkowo wiąże się z rozwojem zmian rozedmowych [21,37-39,57,59]. Jednocześnie część danych sugeruje możliwy efekt protekcyjny CHIT1 w przebiegu choroby, co podkreśla złożoną i nadal nie do końca wyjaśnioną rolę chitynaz w zapaleniu i uszkodzeniu płuc w POChP [44,60].

W przeprowadzonej analizie wskazano również możliwości zastosowania inhibitorów chitynaz w przewlekłych chorobach obturacyjnych- uwzględniając opublikowane doniesienia na modelach zwierzęcych [61,62]. Ze względu na ich pozytywne wyniki, zasugerowano, że supresja aktywności chitynaz może stanowić cel terapeutyczny w chorobach układu oddechowego.

W kolejnej pracy w ramach przewodu doktorskiego, tj. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure* przeanalizowano rolę chitynaz w rozwoju przewlekłego zapalenia w drogach oddechowych w odpowiedzi na ekspozycję na dym tytoniowy.

Przedstawione badanie miało charakter obserwacyjnego badania klinicznego i zostało 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. Rozpoznanie POChP oparto na obrazie klinicznym, historii narażenia na czynniki szkodliwe oraz obecności nieodwracalnej obturacji oskrzeli w badaniu spirometrycznym, zgodnie z wytycznymi GOLD 2018. Grupy kontrolne charakteryzowały się negatywnymi wywiadami w kierunku przewlekłych chorób płuc i objawów oddechowych oraz brakiem obturacji w wykonanym badaniu spirometrycznym. Do badania włączano jedynie pacjentów w stabilnym stanie zdrowia (ustalono arbitralnie okres 6 ostatnich tygodni przed kwalifikacją do badania). Kryteriami wykluczającymi były m.in. aktywna lub niedawno przebyta infekcją dróg oddechowych, zaostrzenie chorób przewlekłych, doustna lub wziewna steroidoterapia, aktywna choroba nowotworowa w wywiadach. Badane grupy badawcze nie różniły się statystycznie pod względem wieku, rozkładu płci oraz BMI. Zakres badania obejmował szczegółowy wywiad kliniczny, ocenę nasilenia objawów (mMRC, CAT), analizę historii palenia i zaostrzeń, badanie fizykalne, spirometrię oraz indukcję plwociny. W plwocinie indukowanej oceniano skład

komórkowy oraz oznaczano stężenia wybranych cytokin zapalnych, metaloproteinazy 9, a także chitynaz (YKL-40, CHIT1) metodą ilościowego testu ELISA. Dodatkowo przeprowadzono ocenę aktywności chitynolitycznej CHIT1. Analiza statystyczna została zaplanowana a priori, z odpowiednim oszacowaniem liczebności grup i obejmowała zarówno porównania międzygrupowe, jak i analizy korelacyjne oraz modele wielowymiarowe. Zastosowana metodyka pozwoliła na kompleksową ocenę zależności pomiędzy stanem klinicznym, czynnością płuc a markerami zapalenia i remodelingu dróg oddechowych u chorych na POChP.

Analiza stężeń oraz aktywności chitynolitycznej plwociny w badanych grupach i zestawienie powyższych danych z wybranymi parametrami stanu zapalnego pozwoliły na uzyskanie następujących wyników. 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 plwocinie stanowi czynnik ryzyka rozwoju POChP, gdyż podwyższone stężenie YKL-40 w plwocinie negatywnie korelowało z parametrami spirometrycznymi (FEV1% w.nal.). Co ciekawe, stężenie oraz aktywność CHIT1 w plwocinie nie różniła się statystycznie między grupami. Nasilenie stanu zapalnego w grupie POChP oraz zdrowych palaczy przejawiało się nie tylko wzrostem całkowitej liczby komórek w indukowanej plwocinie, liczbie neutrofili, makrofagów, ale również wzrostem stężeń i aktywności chitynolitycznej. Dodatkowo wykazano pozytywną korelację między stężeniem i aktywnością CHIT1 oraz stężeniem YKL-40 a stężeniem prozapalnych cytokin- Il-8 oraz MMP-9. Szczegółowa analiza klasterowa grup badanych wykazała dodatkowo, że grupa pacjentów z POChP nie jest jednorodna. Część pacjentów ze zdiagnozowanym POChP, podobnie jak osoby zdrowe (palące jak i niepalące) charakteryzowały się niską aktywnością zapalną (definiowaną jako prawidłowa liczba komórek w plwocinie i niższe stężenie cytokin prozapalnych) oraz niskim stężeniem i aktywnością chitynaz w obrębie dróg oddechowych. Pozostali uczestnicy badania, zdefiniowani jako klaster 2, byli osobami ze stwierdzonym wcześniej POChP. Grupa ta charakteryzowała się bardziej nasilonym stanem zapalnym dróg oddechowych, odzwierciedlonym przez wyższą liczbę komórek zapalnych w plwocinie, wyższymi stężeniami cytokin oraz większą aktywnością i podwyższonymi stężeniami CHIT1 i YKL-40 w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do klastra 1. W następnym etapie badania przeprowadzono szczegółową analizę danych medycznych pacjentów chorujących na POChP. Wykazano, że pacjenci zakwalifikowani do klastra 1 oraz pacjenci z klastra 2 nie różnią się między

sobą pod względem wieku, rozkładu płci, wskaźnika masy ciała (BMI), historii palenia tytoniu ani czynności płuc (FEV1, FEV1/FVC), pomimo istotnych różnic w profilu zapalnym płwociny. Powyższe wyniki mogą wskazywać, że pacjenci z POChP nie stanowią jednorodnej grupy, a występujące różnice w aktywności stanu zapalnego w drogach oddechowych mogą wpływać na dalszy przebieg choroby. Wykazane różnice wskazują na konieczność analizy indywidualnych cech choroby u pacjentów z POChP celem precyzyjnego postępowania terapeutycznego (treatable traits). Konieczne jest prowadzenie dalszych badań obserwacyjnych celem potwierdzenia powyższej hipotezy.

Ostatnia praca z cyklu publikacji pt: *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications*. Dotyczyła analizy stężeń i aktywności chitynolitycznej w płynach z opłucnej wywołanych różnymi schorzeniami oraz ekspresji chitynaz w biopsjach z opłucnej. Przedstawiona praca miała charakter retrospektywnego badania i obejmowała 66 dorosłych pacjentów z wysiękiem opłucnowym, u których wykonywano torakocentezę w 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 ADA, zgodnie z obowiązującymi standardami. Klasyfikację płynu na przebiegowy i wysiękowy oparto na kryteriach Lighta, natomiast rozpoznanie poszczególnych etiologii ustalano na podstawie ściśle określonych kryteriów klinicznych, mikrobiologicznych i histopatologicznych (szczegółowe dane dostępne w pracy oryginalnej). 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. Nie włączano do badania pacjentów, w których w sposób jednoznaczny nie udało się ustalić etiologii płynu, lub gdy z przyczyn technicznych nie uzyskano wystarczającej ilości materiału do dalszych badań. Po przeprowadzonym postępowaniu diagnostyczno-medycznym uzyskano: 14 chorych z gruźliczym płynem opłucnowym, 18 z nowotworowym płynem opłucnowym, 18 z wysiękiem parapneumonicznym oraz 16 pacjentów z przebiegiem opłucnowym, najczęściej związanym z niewydolnością serca (81% przypadków). Analiza porównawcza wykazała, że grupy te były jednorodne pod względem wieku, płci oraz historii palenia tytoniu. Współwystępowanie chorób przewlekłych obserwowano istotnie statystycznie częściej w grupie ze stwierdzonymi przebiegami (najczęstszymi chorobami współistniejącymi była niewydolność serca i

cukrzyca typu 2). Najrzadziej choroby współistniejące rejestrowano w grupie pacjentów z gruczynym wysiękiem. W grupie z wysiękiem nowotworowym najczęstszą przyczyną płynu był rak płuca (szczegółowe dane w pracy oryginalnej). Dodatkowo przeprowadzono analizę immunohistochemiczną biopsatów z materiałów z opłucnej 6 pacjentów ze stwierdzonym gruczynym wysiękiem, które uzyskano z archiwum Pracowni Histopatologicznej szpitala UCK WUM. Następnie wykonano barwienia immunohistochemiczne w celu oceny ekspresji CHIT1 i YKL-40. Do wizualizacji reakcji immunologicznej zastosowano przeciwciała ukierunkowane przeciwko wybranym antygenom YKL-40 i CHIT1 (dane szczegółowe w pracy oryginalnej), a preparaty kontrastowano hematoksyliną. Ocenę patomorfologiczną ziarniników opłucnej przeprowadzono w mikroskopie świetlnym.

Analiza płynów o różnorodnej etiologii tj. prześiek, wysięk parapneumoniczny, nowotworowy i gruczyny pozwoliła wykazać, że najwyższe stężenia CHIT1 oraz YKL-40 występują w płynach o etiologii gruczynowej. Istotnie statystycznie wyższe stężenie YKL-40 występowało w płynie wysiękowym w stosunku do prześieku. Analizując wysięki, wykazano, że stężenie YKL-40 jest wyższe w grupie o etiologii gruczynowej, w stosunku do wysięków parapneumonicznych. Stężenie CHIT1 istotnie różniło się natomiast między pacjentami z wysiękiem gruczynym a nowotworowym. 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). Co więcej, pozytywna korelacja między stężeniem YKL-40 a stężeniem białka całkowitego, glukozą oraz aktywnością LDH może sugerować, że YKL-40 odgrywa rolę w odpowiedzi immunologicznej w przebiegu infekcji prątkiem gruczyny. Powyższą hipotezę wspiera przeprowadzona analiza aktywności immunohistochemicznej w obrębie ziarniników gruczynowych z biopsji opłucnej. Wykazała ona wyraźny, jednoznacznie wykrywalny sygnał YKL-40 w cytoplazmie komórek nabłonkowych oraz komórek wielojądrzastych. Natomiast barwienie CHIT1 było pomijalne. Biorąc pod uwagę odmienny wzór ekspresji chitynaz w ziarninikach sarkoidalnych [48,49], można przypuszczać, że analiza wzorca ekspresji chitynaz w materiałach histopatologicznych może stanowić wartościowy biomarker w diagnostyce różnicowej chorób ziarninikowych. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań analizujących ekspresję powyższych biomarkerów w różnych materiałach tkankowych oraz w różnych chorobach ziarninikowych.

8. Wnioski

Zastosowanie metod badawczych obejmujących analizy biochemiczne i immunohistochemiczne pozwoliło na scharakteryzowanie stężeń, aktywności i ekspresji chitynaz w materiale klinicznym od pacjentów z wybranymi chorobami układu oddechowego, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z POChP i osób z gruźliczym wysiękiem. Wykazano, że chitynazy i białka chitynazopodobne, w szczególności YKL-40, stanowią integralny element procesu zapalnego w powyższych jednostkach chorobowych.

Szczegółowe wnioski przedstawiają się następująco:

1. Chitynazy wydają się uczestniczyć w patofizjologii chorób układu oddechowego, biorąc udział w procesach remodelingu, aktywacji procesu zapalnego i destrukcji mięszu płucnego. Nie ma, jednakże jednoznacznych i mocno udokumentowanych danych o ich dokładnej roli w powyższych procesach. Dostępne informacje uzasadniają prowadzenie dalszych badań nad skutecznością inhibitorów chitynaz w chorobach układu oddechowego.
2. Stężenie YKL-40 w płwocinie indukowanej jest istotnie wyższe u pacjentów z POChP w porównaniu z palaczami bez stwierdzonej choroby układu oddechowego i zdrowymi, niepalącymi ochotnikami. Co więcej, podwyższona wartość tego biomarkera jest związana ze zwiększonym stopniem utraty czynnościowej funkcji płuc (mierzonej jako FEV1% w.nal.).
3. Aktywność zapalna w drogach oddechowych w przebiegu ekspozycji na dym tytoniowy manifestuje się nie tylko wzrostem całkowitej liczby komórek w indukowanej płwocinie, liczbie neutrofilii, makrofagów, ale również wzrostem stężeń i aktywności chitynolitycznej. Wniosek ten potwierdza pozytywna korelacja między stężeniem i aktywnością CHIT1 oraz stężeniem YKL-40 a stężeniem prozapalnych cytokin- Il-8 oraz MMP-9.
4. Pacjenci z POChP stanowią heterogenną grupę. Jedynie część z nich charakteryzuje się zwiększonym stanem zapalnym w drogach oddechowych, z podwyższonym jednocześnie stężeniem CHIT1 oraz YKL-40 oraz zwiększoną aktywnością chitynolityczną. Należy brać to pod uwagę przy ocenie rokowania oraz indywidualizacji terapii wobec określonego pacjenta w przyszłości.

5. Stężenie YKL-40 jest istotnie wyższe w płynie wysiękowym w stosunku do przesięku. Szczegółowa analiza pozwoliła stwierdzić, że stężenie YKL-40 jest istotnie wyższe w grupie płynów o etiologii gruźliczej, w stosunku do wysięków parapneumonicznych. Stężenie CHIT1 istotnie różniło się natomiast między pacjentami z wysiękiem gruźliczym a nowotworowym.
6. Analiza wzorca ekspresji chitynaz pozwoliła wykazać, że w ziarniniakach gruźliczych wykrywa się YKL-40 w cytoplazmie komórek nabłonkowych oraz komórek wielojądrzastych. Nie wykryto ekspresji CHIT1. Powyższy wzorzec pozwala różnicować ziarniniaki gruźlicze od ziarniniaków sarkoidalnych.
7. Stężenie YKL-40 w płynie opłucnowym wykazuje stosunkowo wysoką wartość diagnostyczną w różnicowaniu gruźliczego zapalenia opłucnej od zapaleń opłucnej o innej etiologii oraz koreluje z aktywnością deaminazy adenozykowej (ADA) w płynie opłucnowym.

9. Opinia Komisji Bioetycznej.



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303

Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61

02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl

www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...../A/2018

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 17 września 2018 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Dr n. med. Katarzyna Górka,
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii,
ul. Banacha 1a,
02-097 Warszawa

dotyczącym: akceptacji zmian w dokumentacji obejmujących:

- Program badania, wersja 1.3 z dnia 06.09. 2018r.

do badania pt.: „Ocena aktywności enzymatycznej chitynaz u pacjentów z przewlekłymi chorobami płuc.”

**wyraża następującą
opinię**

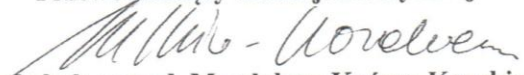
- stwierdza, że są one dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- ~~— stwierdza, że są one niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*~~

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodniczący Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303

Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61

02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl

www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

Warszawa, dnia 08.01.2024

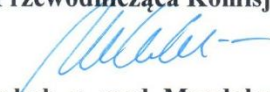
AKBE/ 4 / 2024

Prof. dr hab. .n.med. Rafał Krenke
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,
Pneumonologii i Alergologii
ul. Banacha 1a,
02 – 097 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 08 stycznia 2024 r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt. "Patofizjologia i diagnostyczne znaczenie chitynaz w wysięku gruźliczym." Przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21ust.1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz.U. z 2018 r poz. 617) i nie wymaga uzyskania opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust.1 ww. ustawy.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz

10. Oświadczenia współautorów publikacji.

Lek. Natalia Przysucha

Warszawa, 04.03.2026 r

Lek. Natalia Przysucha

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, stworzenie rycin i tabel.

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Natalia Przysucha

Warszawa, 04.03.2026 r

prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, stworzenie rycin i tabel.

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy

Warszawa, 04.03.2026 r

prof. dr hab. Katarzyna Górka

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:
stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, stworzenie rycin i tabel.

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w tworzeniu koncepcji manuskryptu, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:
stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:
stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy

Katarzyna Górka

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr hab. n. med. M. Paplińska-Goryca

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, współudział w opracowaniu materiału badawczego, współudział w opracowaniu metodologii, współudział w analizie statystycznej.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, współudział w opracowaniu materiału badawczego, współudział w opracowaniu metodologii, współudział w analizie statystycznej.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Natalii Przysuchy

Magdalena Paplińska-Goryca

Dr hab. n. med. Patrycja Nejman-Gryz

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr hab. n. med. Patrycja Nejman-Gryz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w stworzeniu koncepcji publikacji, współudział w opracowaniu materiału badawczego, współudział w opracowaniu metodologii.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Natalii Przysuchy

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,
Pneumonologii i Alergologii
Nejman-Gryz
dr hab. n. med. Patrycja Nejman-Gryz

Dr hab. Marta Maskey-Warzęchowska

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr hab. n. med. Marta Maskey-Warzęchowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w tworzeniu koncepcji manuskryptu, nadzór merytoryczny w trakcie przygotowania manuskryptu oraz redakcję treści manuskryptu.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Natalii Przysuchy

Marta Maskey-Warzęchowska

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr n. med. Małgorzata Proboszcz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego, współudział w opracowaniu metodologii.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy

Małgorzata Proboszcz

Warszawa, 04.03.2026 r

lek. Agata Cyran

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego- analiza patomorfologiczna.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy



Mgr Agnieszka Zagożdżon

Warszawa, 04.03.2026 r

mgr Agnieszka Zagożdżon

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy

Agnieszka Zagożdżon
5.03.2026r.

Dr n. med. Paulina Misiukiewicz-Stępień

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr n. med. Paulina Misiukiewicz-Stępień

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion. Insights and implications* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego. Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował: stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Natalii Przysuchy

Paulina Misiukiewicz-Stępień

Dr n. med. Barbara Dymek

Warszawa, 04.03.2026 r

Dr n. med. Barbara Dymek

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *The role of chitinases in chronic airway inflammation associated with tobacco smoke exposure*, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutacja pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretacja wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek Natalii Przysuchy

B. Dymek

Warszawa, 04.03.2026 r

dr Michał Młacki

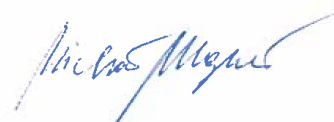
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Exploring CHIT1 and YKL-40 in tuberculous pleural effusion: Insights and implications* (Tuberculosis 155 (2025) 102692; DOI: 10.1016/j.tube.2025.102692) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowił: współudział w opracowaniu materiału badawczego - analiza immunohistochemiczna.

Wkład lek. Natalii Przysuchy w powstawanie publikacji obejmował:

stworzenie koncepcji publikacji, analizę piśmiennictwa, napisanie manuskryptu, przygotowanie metodologii, gromadzenie danych medycznych, rekrutację pacjentów, współudział w opracowaniu materiału badawczego, interpretację wyników, analizę statystyczną.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako części rozprawy doktorskiej lek. Natalii Przysuchy.



11. Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim

1. Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res.* 2005;49:93–135. doi:10.1016/S1043-4526(05)49003-8
2. Stern R. Go fly a chitin: the mystery of chitin and chitinases in vertebrate tissues. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017;22(4):580–595. doi:10.2741/4504 PubMed
3. Tang WJ, Fernandez J, Sohn JJ, Amemiya CT. Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr Biol.* 2015;25(7):897–900. doi:10.1016/j.cub.2015.01.058
4. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol.* 2007;27(1):21–28. doi:10.1080/07388550601168223
5. Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdts S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights.* 2007;2:128–146. doi:10.1177/117727190700200023
6. Kumar A, Zhang KYJ. Human chitinases: structure, function, and inhibitor discovery. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1142:221–251. doi:10.1007/978-981-13-7318-3_11
7. Przysucha N, Górska K, Krenke R. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020;15:885–899. doi:10.2147/COPD.S236640
8. Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ, Aerts JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity: a novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1288–1292. doi:10.1172/JCI117084
9. Dymek B, Sklepkiwicz P, Mlacki M, et al. Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis. *J Inflamm Res.* 2022;15:5621–5634. doi:10.2147/JIR.S378357
10. Sklepkiwicz P, Dymek BA, Mlacki M, et al. Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2022;919:174792. doi:10.1016/j.ejphar.2022.174792
11. Wakita S, Kimura M, Kato N, et al. Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic

- tissue pH conditions. *Carbohydr Polym.* 2017;164:145–153.
doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.095
12. Seibold MA, Donnelly S, Solon M, et al. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):944–950. doi:10.1016/j.jaci.2008.08.023
 13. Ramanathan M, Lee WK, Lane AP. Increased expression of acidic mammalian chitinase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol.* 2006;20(3):330–335. doi:10.2500/ajr.2006.20.2869
 14. Houston DR, Recklies AD, Krupa JC, et al. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(32):30206–30212.
doi:10.1074/jbc.M303371200
 15. Johansen JS, Jensen HS, Price PA. A new biochemical marker for joint injury: analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol.* 1993;32(11):949–955. doi:10.1093/rheumatology/32.11.949
 16. Kzhyshkowska J, Yin S, Liu T, et al. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem.* 2016;397(3):231–247. doi:10.1515/hsz-2015-0269
 17. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(6):599–605. doi:10.1080/00365520310000537
 18. Nøjgaard C, Johansen JS, Christensen E, et al. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2003;39(2):179–186. doi:10.1016/S0168-8278(03)00184-3
 19. Spoorenberg SMC, Vestjens SMT, Rijkers GT, et al. YKL-40, CCL18 and SP-D predict mortality in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respirology.* 2017;22(3):542–550. doi:10.1111/resp.12924
 20. Tong X, Ma Y, Liu T, et al. Can YKL-40 be used as a biomarker for interstitial lung disease? A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(17):e25631. doi:10.1097/MD.00000000000025631
 21. Tong X, Wang D, Liu S, et al. The YKL-40 protein is a potential biomarker for COPD: a systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:409–418. doi:10.2147/COPD.S152655
 22. The Global Asthma Report 2022. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2022;26(Suppl 1):1–104. doi:10.5588/ijtld.22.1010

23. Hekking PPW, Wener RR, Amelink M, et al. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):896–902.
doi:10.1016/j.jaci.2014.08.042
24. Brinchmann BC, Bayat M, Brøgger T, et al. A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Ann Agric Environ Med*. 2011;18(1):7–12.
25. Cartier A, Lehrer SB, Horth-Susin L, et al. Prevalence of crab asthma in crab plant workers in Newfoundland and Labrador. *Int J Circumpolar Health*. 2004;63(2):333–336. doi:10.3402/ijch.v63i0.17930
26. Tanaka H, Saikai T, Sugawara H, et al. Workplace-related chronic cough on a mushroom farm. *Chest*. 2002;122(3):1080–1085. doi:10.1378/chest.122.3.1080
27. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*. 2004;304(5677):1678–1682. doi:10.1126/science.1095336
28. James AJ, Reinius LE, Verhoek M, et al. Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(2):131–142. doi:10.1164/rccm.201504-0760OC
29. Lee JH, Park KH, Park JW, Hong CS. YKL-40 in induced sputum after allergen bronchial provocation in atopic asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(7):501–507.
30. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, et al. Polymorphisms and haplotypes of acidic mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(12):1505–1509. doi:10.1164/rccm.200506-890OC
31. Vicencio AG, Chupp GL, Tsirilakis K, et al. CHIT1 mutations: genetic risk factor for severe asthma with fungal sensitization? *Pediatrics*. 2010;126(4):e982–e985. doi:10.1542/peds.2010-0321
32. Hong JY, Kim M, Sol IS, et al. Chitotriosidase inhibits allergic asthmatic airways via regulation of TGF- β expression and Foxp3⁺ Treg cells. *Allergy*. 2018;73(8):1686–1699. doi:10.1111/all.13449
33. Gomez JL, Yan X, Holm CT, et al. Characterisation of asthma subgroups associated with circulating YKL-40 levels. *Eur Respir J*. 2017;50(4):1700800. doi:10.1183/13993003.00800-2017
34. Saba M, Sharif MR, Akbari H, et al. YKL-40 in asthma and its correlation with different clinical parameters. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(4):271–277.

35. Otsuka K, Matsumoto H, Niimi A, et al. Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*. 2012;83(6):507–519. doi:10.1159/000330840
36. GBD 2021 Global Subarachnoid Hemorrhage Risk Factors Collaborators, Rautalin I, Volovici V, et al. Global, regional, and national burden of nontraumatic subarachnoid hemorrhage: the Global Burden of Disease Study 2021. *JAMA Neurol*. 2025;82(8):765–787. doi:10.1001/jamaneurol.2025.1522
37. Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, et al. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol*. 2010;176(2):638–649. doi:10.2353/ajpath.2010.090455
38. Majewski S, Tworek D, Szewczyk K, et al. Overexpression of chitotriosidase and YKL-40 in peripheral blood and sputum of healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;14:1611–1631. doi:10.2147/COPD.S204019
39. Matsuura H, Hartl D, Kang M-J, et al. Role of breast regression protein-39 in the pathogenesis of cigarette smoke-induced inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(6):777–786. doi: 10.1165/rcmb.2010-0081OC
40. Lee CG, Hartl D, Lee GR, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med*. 2009;206(5):1149–1166. doi: 10.1084/jem.20081271
41. Kang MJ, Homer RJ, Gallo A, et al. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *J Immunol*. 2007;178(3):1948–1959. doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1948
42. Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(1):14–21. doi: 10.4168/aaair.2015.7.1.14
43. Lai T, Wu D, Chen M, et al. YKL-40 expression in chronic obstructive pulmonary disease: relation to acute exacerbations and airway remodeling. *Respir Res*. 2016;17:31. doi: 10.1186/s12931-016-0338-3
44. Tang H, Sun Y, Shi Z, et al. YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF-κB pathways, causing bronchial

- smooth muscle proliferation and migration. *J Immunol.* 2013;190(1):438–446.
doi: 10.4049/jimmunol.1201827
45. Noppen M. Normal volume and cellular contents of pleural fluid. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S201-3. doi: 10.1016/s1526-0542(04)90038-3. PMID: 14980271
 46. Light RW. Pleural diseases. *Dis Mon.* 1992 May;38(5):266-331. doi: 10.1016/0011-5029(92)90007-c.
 47. Porcel JM, Light RW. Pleural effusions. *Dis Mon.* 2013 Feb;59(2):29-57. doi: 10.1016/j.disamonth.2012.11.002.
 48. Nowiński A, ed. *Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2024 r.* Warszawa: Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc; 2025.
 49. Khan FY, Alsamawi M, Yasin M, et al. Etiology of pleural effusion among adults in the State of Qatar: a 1-year hospital-based study. *East Mediterr Health J.* 2011;17(7):611–618. doi:10.26719/2011.17.7.611
 50. Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest.* 2001 Jun;119(6):1737-41. doi: 10.1378/chest.119.6.1737.
 51. Reddy SL, Varaprasad K, Narahari N, et al. Clinical and etiological profile of exudative pleural effusion in a tertiary care center. *Indian J Respir Care.* 2019;8(1):22–26. doi:10.4103/ijrc.ijrc_8_1
 52. Javath Hussain S, Selvaraj J, Mohanty MM, et al. Clinical utility of pleural fluid YKL-40 as a marker of malignant pleural effusion. *Curr Probl Cancer.* 2019;43(4):354–362. doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.10.001
 53. Kim HR, Jun CD, Lee KS, et al. Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease. *Cytokine.* 2012;58(3):336–343. doi:10.1016/j.cyto.2012.03.001
 54. Kayhan S, Gumus A, Cinarka H, et al. The clinical utility of pleural YKL-40 levels in diagnosing pleural effusions. *J Thorac Dis.* 2013;5(5):634–640. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.19
 55. Chen M, Deng J, Li W, et al. The relationship between chitotriosidase activity and tuberculosis. *Epidemiol Infect.* 2015;143(14):3196–3202. doi:10.1017/S095026881500062X

56. Specjalski K, Chełmińska M, Jassem E. YKL-40 protein correlates with the phenotype of asthma. *Lung*. 2015;193(2):189–194. doi:10.1007/s00408-015-9693-y
57. James AJ, Reinius LE, Verhoek M, et al. Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(2):131–142. doi:10.1164/rccm.201504-0760OC
58. Konradsen JR, James A, Nordlund B, et al. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):328–335. doi:10.1016/j.jaci.2013.03.003
59. Létuvé S, Kozhich A, Arouche N, et al. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol*. 2008;181(7):5167–5173. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.5167
60. Guerra S, Halonen M, Sherrill DL, et al. The relation of circulating YKL-40 to levels and decline of lung function in adult life. *Respir Med*. 2013;107(12):1923–1930. doi: 10.1016/j.rmed.2013.07.013
61. Mazur M, Bartoszewicz A, Dymek B, et al. Discovery of selective, orally bioavailable inhibitor of mouse chitotriosidase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(3):310–314. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.047
62. Rao FV, Andersen OA, Vora KA, Demartino JA, van Aalten DM. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chem Biol*. 2005;12(9):973–980. doi: 10.1016/j.chembiol.2005.07.009