

Wstęp

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) stanowi obecnie trzecią co do częstości przyczynę zgonów na świecie, ustępując jedynie chorobom sercowo-naczyniowym i nowotworom. Charakteryzuje się narastającym w czasie upośledzeniem przepływu powietrza w dolnych drogach oddechowych, prowadząc do ich utrwalonej obturacji oraz występowania przewlekłych objawów w postaci upośledzenia tolerancji wysiłku, duszności i kaszlu. Choroba jest nieuleczalna, a dostępne aktualnie strategie terapeutyczne jedynie spowalniają jej postęp. W patogenezie choroby kluczową rolę odgrywa reakcja zapalna dróg oddechowych na dym tytoniowy, szkodliwe cząstki i gazy. Pomimo ugruntowanej roli neutrofilów i makrofagów w rozwoju POChP, dokładne mechanizmy immunologiczne leżące u podłoża choroby nie są do końca poznane. Badania ostatnich lat wskazują na potencjalną rolę innych typów komórek, w tym mastocytów i wydzielanych przez nie mediatorów w rozwoju POChP.

Mastocyty (MC), zwane komórkami tucznyimi, znane są przede wszystkim ze swojej kluczowej roli, jaką pełnią w reakcjach IgE-zależnych i rozwoju chorób alergicznych, takich jak m.in. astma, alergiczny nieżyt nosa czy anafilaksja. W ostatnich latach, wraz z intensyfikacją badań nad MC, nasza wiedza na temat roli MC w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych uległa rewizji. MC, dzięki wyposażeniu w największy spośród wszystkich komórek ciała wachlarz receptorów, strategicznej lokalizacji w tkankach oraz mnogości wydzielanych mediatorów, wpływają na szereg procesów immunologicznych. Komórki te pełnią ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, m.in. w obronie przeciw drobnoustrojom, regeneracji tkanek, czy funkcji regulacyjnych odporności swoistej i nieswoistej. Z drugiej strony, mogą również prowadzić do amplifikacji procesu zapalnego i rozwoju przewlekłego zapalenia, dając podłoże do rozwoju chorób zapalnych, autoimmunologicznych, układu sercowo-naczyniowego, metabolicznych, nerek czy nowotworowych. Ich lokalizacja w układzie oddechowym, różnorodność wydzielanych przez nie mediatorów oraz obecność w kluczowych procesach organizmu sugerują potencjalną rolę tych komórek i uwalnianych przez nie mediatorów w patogenezie POChP.

Eksperymenty *in vitro* i z udziałem zwierzęcych modeli POChP wskazują na potencjalnie niekorzystną rolę MC i wydzielanych przez nie mediatorów w rozwoju POChP, w tym udział komórek w rekrutacji neutrofilów i makrofagów do płuc, rozwoju rozedmy i procesach remodelingu oraz angiogenezy. Wyniki badań *in vivo*, oparte na analizie materiału

biologicznego pobranego od pacjentów z POChP, nie są jednoznaczne. Analiza stężenia tryptazy, swoistego markera aktywności MC, w płwocinie i surowicy pacjentów z zaostrzeniem POChP sugeruje związek MC z parametrami klinicznymi choroby i funkcją płuc. Brak jest badań poddających kompleksowej ocenie stężenia tryptazy u pacjentów w okresie stabilnym POChP, nieobciążonych chorobami mającymi potencjalny wpływ na aktywność MC.

Cele pracy

Głównym celem pracy była ocena stężenia tryptazy (BT), markera aktywności MC, w surowicy (sBT) i płwocinie (pBT) pacjentów w różnych stadiach zaawansowania POChP. Ponadto w pracy podjęto się analizy związku między stężeniem tryptazy w surowicy i w płwocinie a wybranymi parametrami klinicznymi POChP. Celem pracy było także wykazanie zależności między stężeniem tryptazy w surowicy i w płwocinie a wybranymi parametrami funkcji płuc oraz ocena korelacji między stężeniem tryptazy w surowicy i w płwocinie pacjentów z POChP a parametrami systemowego stanu zapalnego.

Material i metody

W badaniu wzięło udział 69 pacjentów. Grupę badaną stanowiło 51 pacjentów z POChP, aktywnych lub byłych palaczy tytoniu (Grupa A), pozostających pod opieką ambulatoryjną Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Średnia wieku chorych wynosiła $60,6 \pm 8$, 54,9% stanowiły kobiety. Średnia liczba paczkołat wynosiła $39,9 \pm 22,4$. Ocenę i klasyfikację kliniczną pacjentów chorujących na POChP przeprowadzono na podstawie wytycznych GOLD z 2023r. 23,5% chorych prezentowało łagodne objawy choroby (mMRC 0-1 i CAT < 10 pkt), pozostałą część grupy stanowili chorzy z nasilonymi objawami POChP. Uwzględniając stopnie obturacji pacjentów przydzielono do następujących grup: GOLD 1 (n=12), GOLD 2 (n=23), GOLD 3 (n=16). Biorąc pod uwagę kategorie kliniczne POChP: 17,6% pacjentów zakwalifikowano do kategorii klinicznej „A”, 56,9% do kategorii „B”, 25,5% – stanowili chorzy z kategorii „E” (pacjenci z dużym ryzykiem zaostrzeń).

Grupę referencyjną stanowiły osoby zdrowe, byli lub aktywni palacze tytoniu (Grupa B, n=18). Pacjenci z grupy referencyjnej nie różnili się pod względem cech demograficznych od grupy badanej.

U wszystkich pacjentów wykonano spirometrię spoczynkową (w grupie A dodatkowo spirometryczną próbę rozkurczową), pobrano krew na badania biochemiczne oraz przeprowadzono

indukcję plwociny. W obu grupach oznaczano stężenie tryptazy w surowicy (sBT) i plwocinie (pBT) metodą ELISA. Ponadto oznaczono stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy oraz morfologię krwi.

Uzyskane informacje zgromadzono w postaci bazy danych, która była analizowana statystycznie z użyciem oprogramowania STATISTICA13.1. Do analizy danych zastosowano testy: Shapiro-Wilk'a, U Mann-Whitney'a, test Welcha, T-Studenta oraz Chi kwadrat. Do oceny korelacji wykorzystano współczynnik korelacji Spearmana.

Wyniki

Wykazano blisko 2-krotnie wyższe stężenie pBT w grupie pacjentów z POChP w porównaniu z grupą kontrolną (Me [Q25-Q75]: 3,65 [2,37-5,43] vs 1,9 [1,71-2,16] $\mu\text{g/l}$; $p < 0,0001$). Stężenie pBT było istotnie wyższe w podgrupie chorych z POChP i wartościami CRP $> 10 \text{ mg/l}$ w porównaniu z pozostałymi pacjentami z grupy A (Me wynosiła odpowiednio 5,565 i 3,6 $\mu\text{g/l}$; $p = 0,004$). Odnotowano również związek pBT w grupie POChP z parametrami funkcji płuc. Stężenie pBT było blisko 2-krotnie wyższe u chorych z POChP i wartościami FEV1 pre $< 1,5 \text{ l}$ w porównaniu z podgrupą chorych z FEV1 pre $\geq 1,5 \text{ l}$ (Me: 4,885 vs 2,61 $\mu\text{g/l}$; $p = 0,02$). Zaobserwowano ujemną korelację między pBT w grupie chorych z POChP a FEV1/FVC pre i stopniem nasilenia obturacji (wyrażonym FEV1). Nie wykazano zależności między pBT a parametrami klinicznymi POChP: wywiadem dotyczącym palenia tytoniu, nasileniem objawów POChP oraz liczbą zaostrzeń. W grupie kontrolnej nie zanotowano związku między pBT a parametrami funkcji płuc. Biorąc pod uwagę analizę sBT, nie wykazano różnic w stężeniu sBT między obu grupami, jak również związku sBT z parametrami funkcji płuc.

Wnioski

1. Podwyższone stężenia pBT u pacjentów z POChP mogą wskazywać na bezpośredni lub pośredni udział mastocytów w rozwoju tej choroby.
2. Związek podwyższonego stężenia pBT w grupie POChP z istotnie podwyższonym CRP ($\geq 10 \text{ mg/l}$) sugeruje relacje pomiędzy zapaleniem systemowym a zapaleniem lokalnym w zakresie dróg oddechowych w tej chorobie.

3. Ujemna korelacja pomiędzy pBT i odpowiedzią na lek rozkurczowy wskazuje na gorszą odpowiedź oskrzeli na podstawowe leki stosowane w terapii POChP.
4. Wyniki badania wskazują na zasadność poszerzenia badań w różnych fenotypach POChP i różnych stadiach zaawansowania choroby.

Summary

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is currently the third leading cause of death worldwide, following only cardiovascular diseases and cancer. It is characterized by progressive airflow limitation in the lower respiratory tract over time, leading to its persistent obstruction associated with chronic symptoms such as reduced exercise tolerance, dyspnoea, and cough. The disease is incurable, and currently available therapeutic strategies only slow its progression. The inflammatory response of the respiratory tract to tobacco smoke, harmful particles, and gases plays a crucial role in the pathogenesis of COPD. While the roles of neutrophils and macrophages in the development of COPD have been established, the exact immunological mechanisms involved are not fully understood. Recent research suggests a potential role of other cell types, including mast cells (MCs) and their mediators, in the disease's development.

MCs are commonly recognized for their role in IgE-dependent reactions and the development of allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, and anaphylaxis. However, recent intensified research has revised our understanding of their role in various physiological and pathological processes. Due to their vast array of receptors, strategic tissue localization, and the multitude of mediators they release, MCs influence various immunological processes. They play an important role in many physiological processes, including antimicrobial defense, tissue regeneration, and specific and nonspecific immunity regulatory functions. On the other hand, they can also contribute to the amplification of the inflammatory process and the development of chronic inflammation, leading to inflammatory, autoimmune, cardiovascular, metabolic, renal, and neoplastic diseases. Given their localization in the respiratory system, the diversity of mediators they secrete, and their presence in key physiological processes, MCs and their mediators may play a role in COPD pathogenesis.

In vitro experiments and studies involving animal models of COPD suggest a potentially detrimental role of MCs and their mediators in the development of COPD, including their involvement in recruiting neutrophils and macrophages to the lungs, emphysema development, and remodeling and angiogenesis processes. However, the results of in vivo research, based on the analysis of biological material obtained from COPD patients, are not conclusive. The analysis of tryptase concentration, a specific marker of MC activity, in the sputum and serum of patients with

COPD exacerbation, suggests a link between MCs and the clinical parameters of the disease and lung function. Nevertheless, there is a lack of studies that comprehensively assess tryptase levels in stable COPD patients without comorbidities that may potentially affect MC activity.

Objectives

The present study aims to assess the levels of tryptase (BT), a marker of MC activity, in COPD patients at various stages through serum (sBT) and sputum (pBT) samples. Additionally, this research undertakes to examine the relationship between serum and sputum tryptase levels and selected clinical parameters of COPD. Furthermore, this study seeks to demonstrate the link between serum and sputum tryptase levels and selected parameters of lung function while also evaluating the correlation between serum and sputum tryptase levels of COPD patients and parameters of systemic inflammation.

Method and material

Sixty-nine patients participated in the study. The study group consisted of 51 patients with COPD, who were current or former tobacco smokers (Group A), and were being treated under the outpatient care of the Department of Internal Medicine, Pneumonology, and Allergology at the Wroclaw Medical University. The average age of the patients was 60.6 ± 8 years, with 54.9% being female. The mean number of pack-years was found to be 39.9 ± 22.4 .

The COPD patients were evaluated and classified according to the latest 2023 GOLD guidelines with 23.5% of the patients presenting mild disease symptoms (mMRC <2 and CAT <10 points).

The rest of the group had more severe COPD symptoms. The patients were assigned to the following groups based on the degree of airflow obstruction: GOLD 1 (n=12), GOLD 2 (n=23), GOLD 3 (n=16). Based on the clinical categories of COPD, 17.6% of patients were classified into clinical category "A", 56.9% into category "B" and 25.5% were patients in category "E"(patients at high risk of exacerbation). The reference group (Group B, n=18) consisted of healthy individuals who were current or former tobacco smokers and did not differ in terms of demographic characteristics from the study group.

Forced spirometry was performed on all patients, with an additional post-bronchodilator test in Group A. Blood samples were taken for biochemical tests, and sputum induction was conducted. Tryptase concentration in serum (sBT) and sputum (pBT) was determined using the ELISA method

in both groups. Additionally, C-reactive protein (CRP) concentration in serum and blood morphology were measured.

The data obtained from this study were collected in a database that was statistically analyzed using STATISTICA13.1 software. The variables analysis included the following tests: Shapiro-Wilk U Mann-Whitney, Welch's test, T-Student, and Chi-square. Spearman's correlation coefficient was used to demonstrate the relationship between variables.

Results

The study revealed that patients suffering from COPD exhibited notably higher sputum BT levels and nearly twice the concentration of pBT in comparison to healthy subjects (Median [Q25-Q75]: 3.65 [2.37-5.43] vs. 1.9 [1.71-2.16] $\mu\text{g/l}$; $p < 0.0001$). Moreover, the subgroup of COPD patients with CRP values $> 10 \text{ mg/l}$ demonstrated significantly higher pBT concentration compared to the remaining patients in Group A (Medians were 5.565 and 3.6 $\mu\text{g/l}$, respectively; $p = 0.004$). In addition, an association between pBT in the COPD group and lung function parameters was observed. The pBT concentration was almost twice as high in COPD patients with pre-FEV1 < 1.5 liters in comparison to the subgroup of patients with pre-FEV1 ≥ 1.5 liters (Median: 4.885 vs. 2.61 $\mu\text{g/l}$; $p = 0.02$). A negative correlation was identified between pBT in the COPD group and pre-FEV1/FVC ratio as well as the degree of airflow obstruction (expressed as FEV1). However, no connection was found between pBT and clinical parameters of COPD, such as smoking history, COPD symptom severity, or the number of exacerbations in the COPD group. In the control group, there was no correlation between pBT and lung function parameters. Regarding the analysis of sBT (serum tryptase), no differences in sBT concentration were found between the two groups, and there was no association between sBT and lung function parameters.

Conclusions

Based on the findings, the following conclusions were drawn:

1. The increased concentration of pBT in COPD patients may imply the direct or indirect involvement of mast cells in the development of this disease.

2. The association between the elevated concentration of pBT in the COPD group and significantly raised CRP (≥ 10 mg/l) indicates a relationship between systemic inflammation and local airway inflammation in this disease.
3. The negative correlation between pBT and the response to bronchodilators suggests a poorer bronchial response to the basic drugs used in COPD therapy.
4. The study results support the need for further research into various COPD phenotypes and different stages of the disease.