

Effect of loratadine on YKL-40 production in Mite extract stimulated A549 and THP-1 cells

Zeinab Baqernezhadan, Hasan Darbandi Tamijani, Mostafa Hajimollahoseini*

Department of Medical Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2018/02/4

Accept: 2018/09/2)

Abstract

Background: The chitinase-like protein, YKL-40, plays an important role in allergic diseases pathogenesis. Allergens induce its production from macrophages and epithelial cells. Some investigations indicated that loratadine has anti-inflammatory effects apart from its H1 receptors antagonist activity. We made an attempt to know whether human epithelial cells and macrophages stimulated for YKL-40 synthesis by house dust mite (HDM) extract might be influenced by loratadine. We used the human pulmonary type II epithelial cell line A549 and the human monocytic cell line (THP-1) for our in vitro study.

Materials and method: In the present experimental study, after dose-finding studies using neutral red cytotoxicity assay, the cells were pre-incubated with loratadine (0.5 µg/ml) and then stimulated using HDM extract (GREER Lab). Also, in post-treatment condition, A549 and THP-1 cells were stimulated with HDM extract followed by incubation with loratadine. Finally, the amount of YKL-40 released into the cell supernatants was determined using a specific ELISA. Data were analyzed using SPSS software, v.16.

Results: A549 cells cannot produce and secrete YKL-40 at baseline level or in HDM stimulated condition. In spite of A549, THP-1 cells stimulated with HDM extract showed a significantly increased release of YKL-40. In comparison with control cells, Pre-incubation with loratadine diminished the YKL-40 release from the HDM stimulated THP-1 cells in a significant manner. The YKL40- level in loratadine group was 4470 pg/ml while it was 8700 pg/ml in the control group ($P \leq 0.05$). Although in HDM pretreated cells followed by incubation with loratadine YKL-40, no decrease was found. The Neutral Red Assay results represented nontoxicity of treatments.

Conclusions: A549 cells that are used widely in in-vitro models of allergic reactions cannot produce YKL-40 as a mediator of allergic reactions. Therefore, this cell line should not be used alone in these studies. Loratadine may have anti-inflammatory effects by suppressing YKL-40 secretion from myeloid cells. As for the ability of loratadine to attenuate YKL-40, we suggest that further studies are warranted to examine its therapeutic potential in diseases that YKL-40 plays a critical role in the pathogenesis.

Keywords: Allergy; Loratadine; YKL-40

*Corresponding author: Mostafa Hajimollahoseini
Email: hajimollahoseini@yahoo.com

بررسی اثر لوراتادین بر ترشح شبه کیتیناز YKL-40 در سلول‌های اپیتلیال آلوئولار ریه (A549) و سلول‌های مونوسیتی (THP-1) تحریک شده با عصاره مایت

زینب باقرنژادان، حسن دربندی، مصطفی حاجی ملاحسینی*

گروه ایمونولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۱۱

چکیده:

سابقه و هدف: شبه کیتیناز YKL-40 تحت تاثیر عوامل آلرژیک از سلول‌های اپیتلیال و ماکروفاژ ترشح می‌شود و در آسیب‌زایی آلرژی‌ها نقش ایفا می‌کند. برخی از آنتی‌هیستامین‌ها از جمله لوراتادین ممکن است دارای آثار ضد التهابی نیز باشند. البته در مورد آثار ضد التهابی لوراتادین توافق نظر وجود ندارد. برای ارزیابی اثر ضد التهابی لوراتادین تاثیر آن بر ترشح شبه کیتیناز YKL-40 در دو رده سلولی A549 و THP-1 تحریک شده با آلرژن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی است. پس از مطالعه‌های تعیین دوز با استفاده از روش سایتوتوکسیسیته نوترال رد سلول‌های اپیتلیال آلوئولار تیپ II (A549) و سلول‌های مونوسیتی (THP-1) به تعداد 2×10^4 cell/well در دو حالت قبل و بعد از مواجهه با عصاره مایت (500 U/ml) تحت تیمار با لوراتادین (0/5 ug/ml) قرار گرفتند. در نهایت در مایع رویی کشت سلولی میزان شبه کیتیناز YKL-40 به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماري SPSS 16 تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: سلول‌های A549 مولد YKL-40 نبودند و حتی در مواجهه با عصاره مایت نیز قادر به تولید و ترشح این کیتیناز نبودند. سلول‌های THP-1 قادر به ترشح YKL-40 بودند. پیش تیمار (Pretreatment) با لوراتادین تولید و ترشح YKL-40 از سلول‌های THP-1 تحریک شده با آلرژن را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. میزان YKL-40 در سلول‌های دریافت کننده لوراتادین 4470 پیکوگرم بر میلی‌لیتر بوده در حالی که در گروه کنترل 8700 پیکوگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد ($P \leq 0.05$). البته در سلول‌هایی که ابتدا با آلرژن تحریک شدند و سپس لوراتادین دریافت کردند، کاهش میزان YKL-40 دیده نشد. نتایج آزمایش نوترال رد هم نشان داد که تیمارها و سایر عوامل اثر توکسیک بر سلول‌ها نداشته‌اند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های A549 که در مطالعه‌های برون تی مدل‌های واکنش آلرژیک به طور گسترده استفاده می‌شوند قادر به تولید YKL-40 به عنوان یک واسطه مهم واکنش‌های آلرژیک نیستند و استفاده از این رده سلولی به تنهایی نباید مبنای مطالعه‌های برون تی واکنش‌های آلرژیک قرار گیرد. لوراتادین با مهار ترشح شبه کیتیناز YKL-40 از سلول‌های میلوئیدی ممکن است دارای اثر ضد التهابی نیز باشد. با توجه به مشاهده اثر داروی لوراتادین در کاهش YKL-40 در مطالعه فعلی، انجام مطالعه‌های تکمیلی در زمینه امکان بررسی تجویز لوراتادین در بیماری‌هایی که این شبه کیتیناز نقش آسیب‌زایی دارد پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: آلرژی، لوراتادین، شبه کیتیناز YKL-40

مقدمه:

خانواده از این پروتئین‌ها در انسان و موش شناسایی شده است (۳-۶) اما فقط Acidic Mammalian Chitinase (AMCase) و کیتوتربوزیداز کیتیناز حقیقی بوده و قادر به تجزیه مواد کیتینی هستند (۷) و بقیه آن‌ها شبه کیتیناز بوده و به رغم توانایی اتصال به کیتین، فعالیت آنزیمی ندارند (۷،۸). کیتینازهای حقیقی

کیتینازها و پروتئین‌های شبه کیتیناز (CLPs) متعلق به خانواده حفاظت شده‌ای تحت عنوان glycosyl hydrolase family 18 هستند که در طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها از پروکاریوت تا انسان بیان می‌شوند (۱،۲). تا کنون بیش از هفت

نویسنده مسئول: مصطفی حاجی ملاحسینی
پست الکترونیکی: hajimolahoseini@yahoo.com

باید اضافه می‌شد.

تحریک (عصاره مایت) و تیمار (لوراتادین) سلول‌ها

سلول‌های A549 و THP-1 به صورت جداگانه به تعداد 2×10^4 cell/well در صورت شش تکرار در پلیت ۹۶ چاهکی کشت سلولی کشت داده شدند به طوری که حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر باشد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با پنج درصد CO₂ و رطوبت اشباع انکوبه شدند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، سوپرناتانت کشت سلولی جمع‌آوری شد. به گروه تست ۲۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۵ μg/mL لوراتادین و به گروه‌های کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محیط فاقد لوراتادین اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سوپرناتانت گروه‌ها جمع‌آوری و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۵۰۰ U/mL عصاره مایت اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه شدند و پس از پایان زمان انکوباسیون سوپرناتانت تمام گروه‌ها جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش الیزا نگهداری شد و سلول‌ها نیز وارد آزمایش نوترال رد شدند.

در حالت تیمار متعاقب تحریک (Post-treatment) سلول‌ها ابتدا با ۵۰۰ U/mL عصاره مایت تحریک شده و سپس با ۵ μg/mL لوراتادین تیمار شدند.

آزمایش نوترال رد

بقای سلولی بر اساس توانایی سلول‌های زنده در جذب و نگه‌داری رنگ حیاتی نوترال رد، در درون لیزوزوم‌ها مطابق با پروتکل رایج (۳۰) سنجیده شد. به این ترتیب که ابتدا یک محلول استوک نوترال رد با غلظت ۴ mg/ml تهیه شد. سپس از این محلول غلظت ۴۰ μg/ml در محیط کشت تهیه شد. صد میکرولیتر محیط کشت حاوی نوترال رد به سلول‌ها اضافه شد و به مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سه ساعت، چاهک‌ها از محیط حاوی نوترال رد تخلیه شده و با ۱۵۰ میکرولیتر PBS به ازای هر چاهک شست‌وشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر حلال (۵۰ درصد اتانول ۹۶ درجه، ۴۹ درصد آب دیونیزه و یک درصد اسید استیک) اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. در نهایت درصد بقای سلولی با استفاده از محاسبه نسبت جذب نوری گروه‌های تیمار به گروه کنترل به دست آمد.

اندازه‌گیری YKL-40

میزان YKL-40 در سوپرناتانت کشت‌های سلولی با استفاده از کیت شرکت R&D Systems (USA) مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام شد. از نمونه سرم مبتلایان به سرطان سینه نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به اختصار اینکه ابتدا آنتی بادی ضد YKL-40 در کف پلیت الیزا کوت شد و پس از بلاکینگ، سوپرناتانت کشت سلولی و استانداردها اضافه شدند و پس از انکوباسیون، آنتی‌بادی بیوتیلینه ضد YKL-40 و در نهایت استرپتوآویدین کونژوگه با پراکسیداز اضافه شد و با کمک سوپسترای TMB فرایند الیزا ادامه یافت. واکنش رنگ‌زایی با استفاده از اسیدسولفوریک متوقف شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب نوری مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت این کیت ۳۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر است.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شدند. برای انجام محاسبه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. از آزمون غیرپارامتریک Man-Witny U برای مقایسه استفاده شد و $p \leq 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتیجه آزمایش نوترال رد

از آزمایش نوترال رد برای ارزیابی اثر توكسكیك لوراتادین (0/5 μg/mL) و عصاره مایت (500 U/mL) که با تکرار آزمایش و استناد به مطالعه‌های قبلی (۲۷، ۲۹، ۳۱) به دست آمد، استفاده شد. نتیجه آزمایش (نمودار ۱) بیانگر آن بود که این محرک‌ها برای سلول‌های A549 در طول مدت زمان کشت و مواجهه، کشنده نیستند و همواره بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده هستند. بررسی‌های میکروسکوپی هم نشان داد که سلول‌ها از نظر متابولیک فعال بوده و قادر به جذب رنگ حیاتی نوترال رد هستند (تصویر ۱).

علاوه بر دومن متصل شونده به کیتین، دارای یک دومن فعال آنزیمی نیز هستند و پیوندهای گلیکوزیدی β1-۴ موجود در کیتین را هیدرولیز می‌کنند. به‌رغم آنکه سوپسترای اندوزن برای کیتینازهای حقیقی در پستانداران شناسایی نشده است اما مطالعه‌های جدید نشان داده‌اند که این آنزیم‌ها نقش مهمی در التهاب، آسیب بافتی و پاتوژن بیماری‌های انسان ایفا می‌کنند (۱۲-۷۹). شبه کیتیناز YKL-40 توسط ژن CHI3L1 در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها بیان می‌شود (۱۳، ۱۴). این شبه کیتیناز فعالیت‌هایی مشابه سایتوکاین دارد و بیش از سایر شبه کیتینازها مطالعه شده است و افزایش مقادیر آن در بیماری‌های التهابی مختلف گزارش شده است (۲۰-۹، ۱۵). از جمله اینکه مطالعه‌های مختلفی نشان دادند که بین سطوح سرمی بالای YKL-40 و بیماری‌های آلرژیک ارتباط وجود دارد (۲۱، ۲۲). مطالعه سطوح سرمی YKL-40 در بیماران مبتلا به آسم نشان داده است که افزایش سطح سرمی YKL-40 با شدت بیماری، تغییر شکل راه‌های هوایی^۱ و کاهش عملکرد ریه ارتباط دارد (۲۳). از این رو محققان، ژن CHI3L1 را به عنوان یک ژن مستعد کننده برای آسم و کاهش عملکرد ریه گزارش کرده‌اند (۲۴). مطالعه‌هایی نشان دادند که این شبه کیتیناز حداقل بخشی از آثار التهاب زای خود را از طریق مهار آپاتوز سلول‌های التهابی انجام می‌دهد.

لوراتادین یکی از آنتی هیستامین‌های شناخته شده است. تحقیق‌های مختلفی نشان داده است که این دارو آثار ضد التهابی نیز دارد (۲۸-۲۵). در این تحقیق برای تعیین اثر ضد التهابی لوراتادین، تاثیر این دارو بر تولید YKL-40 از سلول‌های اپیتلیالی و منوسیتی ارزیابی شد. این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

نوع مطالعه: این مطالعه از نوع تجربی است.

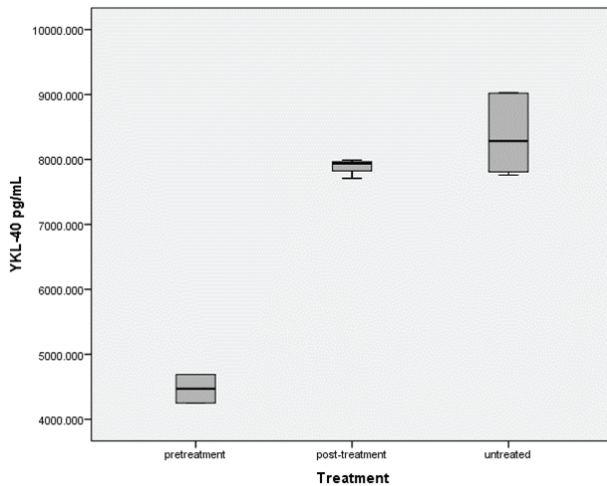
محرک‌ها و غلظت مورد استفاده از آن‌ها

عصاره مایت از آزمایشگاه GREER (Lenoir, North Carolina, USA) خریداری و غلظت ۵۰۰ U/ml از آن در محیط کشت RPMI 1640 پس از انجام مطالعه‌های اولیه (dose finding study) تهیه شد و در این تحقیق به کار رفت. لوراتادین خالص از شرکت داروپخش (تهران، ایران) تهیه و محلول استوک آن با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر DMSO تهیه شد و غلظت ۵ μg/mL در محیط کشت RPMI 1640 بر اساس مطالعه‌های قبلی و مطالعه‌های Dose Finding خود، برای آزمایش‌ها انتخاب شد.

کشت سلولی

رده سلولی A549 از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران خریداری شد. سلول‌ها مطابق پروتکل رایج به شرح زیر کشت داده شدند (۲۹). سلول‌های A549 در محیط کشت کامل (۸۹ میلی‌لیتر RPMI 1640، ۱۰ میلی‌لیتر FBS، یک میلی‌لیتر مخلوط آنتی بیوتیک‌های پنسیلین - G استرپتومایسین) کشت داده شدند و در انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت اشباع انکوبه شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۸۰ درصد، محیط کشت تخلیه شده و سطوح داخلی فلاسک با PBS استریل شست‌وشو داده شد، سپس یک میلی‌لیتر محلول تریپسین-ای‌دی، تی‌آ (۰/۲۵ درصد) به فلاسک اضافه کرده و به مدت ۵ تا ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس و مشاهده جدا شدن آن‌ها پنج میلی‌لیتر محیط کامل به فلاسک اضافه کرده و به این ترتیب تریپسین رقیق و خنثی شد. سپس سوسپانسیون سلولی در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه مایع رویی به رسوب سلولی یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل اضافه کرده و به کمک پیپت پاستور سوسپانسیون سلولی یکنواختی حاصل آمد. با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی تربیان بلو درصد زنده بودن سلول‌ها محاسبه شده و با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد و سپس سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی برای تحریک و تیمار توزیع شدند. فرایند تکثیر رده مونسیتی THP-1 نیز به همین ترتیب انجام شد با این تفاوت که به محیط کشت این سلول‌ها همواره ۰/۰۵ میلی مولر 2-ME

مقدار YKL-40 در مایع رویی سلول‌های THP-1 در حالت Pre-treatment، ۴۴۷۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که در مقایسه با کنترل منفی (۸۷۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) تفاوت معناداری دارد ($p \leq 0.05$). در حالی که مقدار YKL-40 در مایع رویی سلول‌های THP-1 در حالت Post-treatment، ۷۸۸۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که با کنترل منفی (۸۰۳۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) تفاوت معنادار ندارد. بنابراین نتایج فوق حاکی از آن است که تیمار سلول‌های THP-1 با لوراتادین و متعاقب آن تحریک آن‌ها با آلرژن، ترشح YKL-40 را از این سلول‌ها مهار کند، اما در شرایط Post-treatment که ابتدا سلول‌ها با آلرژن تحریک شده و سپس تیمار شده‌اند لوراتادین قادر به مهار YKL-40 نیست (نمودار ۳).



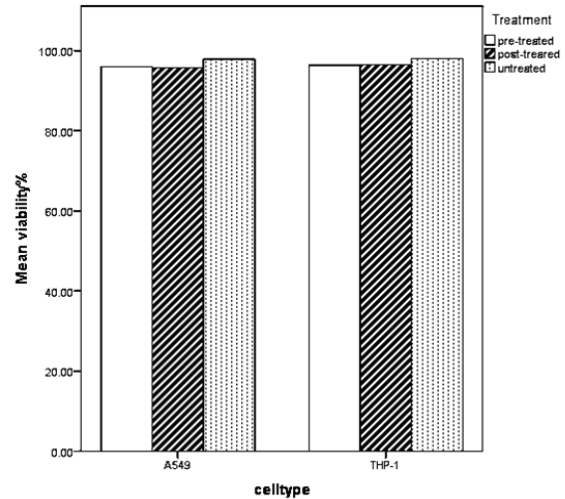
نمودار ۳) مقایسه اثر لوراتادین بر تولید YKL-40 از سلول‌های THP-1 در شرایط پیش از تیمار و پس از تیمار با لوراتادین.

بحث و نتیجه‌گیری:

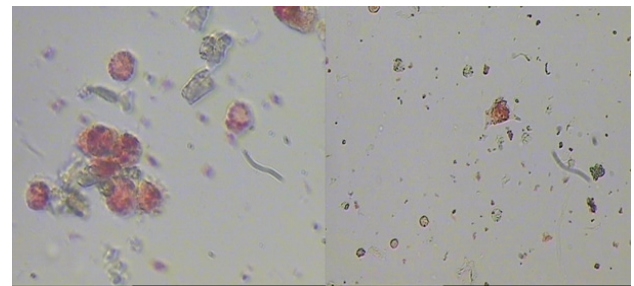
این مطالعه نشان داد که لوراتادین در غلظت ۵ μg/ml تولید شبه کیتیناز YKL-40 را از سلول‌های منوسیتی THP-1 در حالت پیش تیمار تضعیف می‌کند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های آلوولار تیپ II ریه (A549) قادر به تولید و ترشح شبه کیتیناز YKL-40 که از جمله مدیاتورهای اصلی در آسیب‌زایی واکنش‌های آلرژیک (۱۱,۳۲,۳۳) است، نیستند. برای اطمینان از عدم تولید و ترشح این شبه کیتیناز توسط سلول‌های A549، آزمایش الیزا علاوه بر مایع رویی کشت سلولی در لایزیت سلول A549 و همچنین سرم مبتلایان به سرطان سینه به عنوان کنترل مثبت انجام شد که مقادیر معناداری از YKL-40 در نمونه سرم اندازه‌گیری شد.

البته مطالعه قبلی ما برای اولین بار نشان داد که بیان دائمی ژن YKL-40 در سلول‌های A549 اتفاق می‌افتد (۳۱). اما مطالعه فعلی بیانگر این است که تولید و ترشح پروتئین YKL-40 توسط این سلول انجام نمی‌شود و بنابراین سلول‌های A549 به رغم بیان ژن YKL-40 قادر به تولید محصول پروتئینی نبوده، بنابراین برای مطالعه‌های کیتینازها و شبه کیتینازها مدل مناسبی نیستند.

از آنجا که سلول‌های اپیتلیال تنفسی در پاتوژن التهاب راه‌های هوایی و واکنش‌های آلرژیک نقش مرکزی ایفا می‌کنند، بنابراین از این سلول‌ها به طور گسترده در مطالعه‌های برون تنی آلرژیک و التهاب راه‌های هوایی استفاده می‌شود. از جمله این مطالعه‌ها؛ بررسی تولید سایتوکاین‌های التهابی از جمله؛ IL-8 و IL-6 طی تیمار با عوامل مولد آلرژیک مانند عصاره مایت، بررسی اثر داروهای آنتی رینیت از جمله لوراتادین و سیتیزین بر مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی و ارزیابی آثار ضدالتهابی و ضدآلرژیک ترکیب‌های کاندید است و چنین به نظر می‌رسد که سلول‌های اپیتلیال تنفسی از جمله سلول‌های A549 ابزار مناسبی برای یافتن و توسعه داروها و استراتژی‌های درمانی جدید در درمان التهاب آلرژیک راه‌های هوایی هستند.



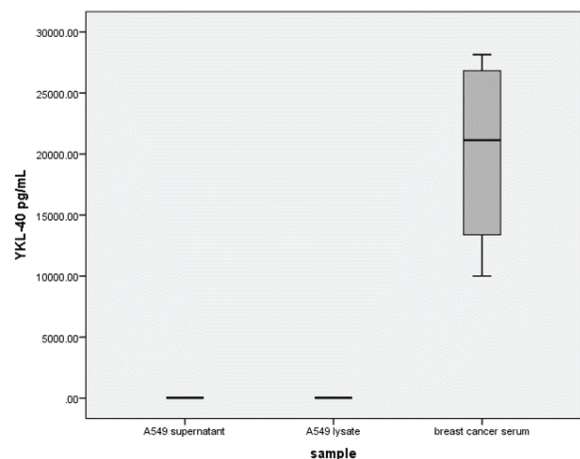
نمودار ۴) بررسی سایتوتوکسیسته محرک‌های معلوم با غلظت مشخص در پایان کشت ۷۲ ساعته سلول‌های A549 و THP-1.



تصویر ۱) سلول A549 (تصویر سمت راست) - سلول THP-1 (تصویر سمت چپ) در آزمایش نوترال رد

اندازه‌گیری YKL-40 در سلول‌های A549

در نمونه سرم بیماران مبتلا به سرطان سینه، متوسط میزان 20 ± 4 YKL-40 نانوگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد، در حالی که در مایع رویی کشت سلولی و لایزیت A549 میزان قابل تشخیصی از YKL-40 وجود نداشت (نمودار ۲).



نمودار ۲) عدم تولید و ترشح YKL-40 در سلول‌های A549. نمونه سرم بیماران مبتلا به سرطان سینه به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

اثر لوراتادین بر تولید YKL-40 در سلول‌های THP-1 در شرایط پیش و پس از تیمار (Pre-treatment & Post-treatment)

منابع:

1. Bussink AP, Speijer D, Aerts JMFG, Boot RG. Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases. 2007;970(October):959-70.
2. Funkhouser JD, Jr NNA. Chitinase family GH18 : evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. 2007;16:1-16.
3. Brodaczewska K, Donskow-Iysoniewska K, Doligalska M. Chitin , a key factor in immune regulation : lesson from infection with fungi and chitin bearing parasites. 2015;60(2):337-44.
4. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. Trends Immunol [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(9):402-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.06.006>
5. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine : present status and some moving trends. 2007;(April):999-1030.
6. Lee CG, Silva CA Da, Lee J, Hartl D, Elias JA. Chitin regulation of immune responses : an old molecule with new roles. Curr Opin Immunol. 2008;20:684-9.
7. Lee CG, Silva CA Da, Cruz CS Dela, Ahangari F, Ma B, Kang J, et al. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury. 2013;1-28.
8. M. A. ESTEBAN, V.MULERO, A.CUESTA JO xO AJM. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (Sparus aurata L .). 2000;543-54.
9. Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T H 2 inflammation and asthma. J Allergy Clin Immunol. Elsevier; 2005;116(3):497-500.
10. Lee CG. Chitin , Chitinases and Chitinase-like Proteins in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling. 2009;50(1):22-30.
11. Lee CG, Elias JA. Role of breast regression protein-39 / YKL-40 in asthma and allergic responses. 2010;2(1):20-7.
12. Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, 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. Rockefeller Univ Press; 2009;206(5):1149-66.
13. Cuesta A. Fish & Shellfish In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (Sparus aurata L .). 2003;15:1-11.
14. Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuku S, Morimoto M. Functional Biomaterials Chitin , Chitosan , and Its Derivatives for Wound Healing : Old and New Materials. 2015. 104-142 p.
15. HUANG. YKL-40 : a Potential Biomarker for Osteoarthritis. 2009;37(1):18-24.
16. Mizoguchi E. Chitinase 3-Like-1 Exacerbates Intestinal Inflammation by Enhancing Bacterial Adhesion and Invasion in Colonic Epithelial Cells. 2006;(Cd):398-411.
17. Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease. 2003;40:254-9.
18. Copenhagen M, Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. 2000;(10):911-20.
19. Pungpapong S, Nunes DP, Krishna M, Nakhleh R, Chambers K, Ghabril M, et al. Serum Fibrosis Markers Can Predict Rapid Fibrosis Progression After Liver Transplantation for Hepatitis C. 2008;(Da 19841):1294-302.
20. Shuhui L, Mok Y, Fred WS. Role of Mammalian Chitinases in Asthma. 2009;369-77.
21. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair S V, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials — A short review. Carbohydr Polym [Internet]. Elsevier Ltd.; 2010;82(2):227-32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>
22. Zdarta J, Klapiszewski L, Wysokowski M, Norman M, Kołodziejczak-radzimska A, Moszyński D, et al. Chitin-Lignin Material as a Novel Matrix for Enzyme Immobilization. 2015;2424-46.
23. Bueter CL, Specht CA, Levitz SM. Innate Sensing of Chitin and Chitosan. 2013;9(1):1-3.
24. Dong B, Li D, Li R, Chen SC, Liu W. A Chitin-Like Component on Sclerotic Cells of *Fonsecaea pedrosoi* Inhibits Dectin-1-Mediated Murine Th17 Development by Masking β -Glucans. 2014;1-20.
25. Lippert U. Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H 1 - and H 2 -receptor antagonists. 2000;(4):118-24.
26. Papi A, Papadopoulos NG, Stanciu LA, Degitz K, Holgate ST, Johnston SL. Effect of desloratadine and loratadine on rhinovirus-induced intercellular adhesion molecule 1 upregulation and promoter activation in respiratory epithelial cells. ALLERGY CLIN Immunol. 2001;221-3.
27. Cheng K-C. Influence of cetirizine and loratadine on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8 release in A549 human airway epithelial cells stimulated with interleukin-1beta. 2006;(II).
28. Wu R, Anthes JC, Harris AG, Jr EW. Desloratadine Inhibits Constitutive and Histamine-Stimulated Nuclear Factor- κ B Activity Consistent with Inverse Agonism at the Histamine H 1 Receptor. 2004;135:313-8.
29. Srivastava S, Dighe SR. Inhibitory Effect of E-RH-06 on HDM-induced Secretion of IL-6 and IL-8 in rhinitis. Int J Sci Res Publ. Citeseer; 2012;2(11):1-6.
30. Ates G et al. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. Methods Mol Biol. 2017;1601:19-26.
31. Alimohammadi M, Yeganeh F, Hoseini MHM. Preliminary Study on Gene Expression of Chitinase-Like Cytokines in Human Airway Epithelial Cell Under Chitin and Chitosan Microparticles Treatment. Inflammation. Springer; 2016;1-8.
32. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. N Engl J Med. Mass Medical Soc; 2007;357(20):2016-27.
33. Ober C, Ph D, Tan Z, Ph D, Sun Y, Possick JD, et al. Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. 2009;358(January 1993):1682-91.
34. Adam E, Hansen KK, Astudillo OF, Coulon L, Bex F, Duhant X, et al. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism. J Biol Chem. ASBMB; 2006;281(11):6910-23.
35. Mazzarella G, Esposito V, Bianco A, Ferraraccio F, Prati M V, Lucariello A, et al. Inflammatory effects on human lung epithelial cells after exposure to diesel exhaust micron sub particles (PM 1.0) and pollen allergens. Environ Pollut [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;161:64-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.046>
36. Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. 2004;562:119-31.
37. Esposito V, Lucariello A, Savarese L, Cinelli MP, Ferraraccio F, Bianco A, et al. Morphology changes in human lung epithelial cells after

- exposure to diesel exhaust micron sub particles (PM 1 . 0) and pollen allergens. Environ Pollut [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;171:162–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.006>
38. Mazzarella G, Lucariello A, Bianco A, Calabrese C, Thanassoulas T, Savarese L, et al. Exposure to Submicron Particles (PM 1 . 0) from Diesel Exhaust and Pollen Allergens of Human Lung Epithelial Cells Induces Morphological Changes of Mitochondria Tonofilaments and Rough Endoplasmic Reticulum. 2014;562:557–61.
39. Jepsen KF, Abildtrup A, Larsen ST. Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. 2004;18:265–9.
40. Pariselli F, Sacco MG, Ponti J, Rembges D. Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). 2009;61:381–6.
41. Bardet G, Achard S, Loret T, Desauziers V, Momas I, Seta N. A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. 2014;229:144–9.
42. Persoz C, Achard S, Leleu C, Momas I, Seta N. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. Toxicol Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010;195(2-3):99–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.003>
43. Mascelloni M, Delgado-saborit JM, Hodges NJ, Harrison RM. Study of gaseous benzene effects upon A549 lung epithelial cells using a novel exposure system. Toxicol Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;237(1):38–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.05.015>
44. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Sapsford RJ, Czarlewski W, Campbell AM, et al. Effect of loratadine on nitrogen dioxide – induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:93–9.