

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

Zeinab Baquernezhadan, Hasan Darbandi Tamijani, Mostafa Hajimollahoseini<sup>1\*</sup>

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 THP1- 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 THP1- 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: hajimolahoseini@yahoo.com

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

\* زینب باقرنژادان، حسن دربندی، مصطفی حاجی ملاحسینی<sup>۱</sup>

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 40-YKL تحت تاثیر عوامل آلوئولار گریزیک از سلول‌های اپیتلیال و ماکروفاز ترشح می‌شود و در آسیب‌زنی آلوئولار نقش ایفا می‌کند. برخی از آتنی‌های هستامین‌ها 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 40-YKL در دو رده سلولی A549 و THP-1 تحریک شده با آلوئولار بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع تجربی است. پس از مطالعه‌های تعیین دوز با استفاده از روش سایتو توکسیسیته نوتال رد سلول‌های اپیتلیال آلوئولار تیپ II (A549) و سلول‌های مونوцитی (THP-1) به تعداد  $2 \times 10^4$  cell/well در دو حالت قبل و بعد از مواجهه با عصاره مایت (500 U/ml) تحت تیمار با لوراتادین (0.5 μg/ml) قرار گرفتند. در نهایت در مایع رویی کشت سلولی میزان شبه کیتیناز 40-YKL به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** سلول‌های A549 مولد 40-YKL 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 40-YKL از سلول‌های THP-1 تحریک شده با آلوئولار کنترل کاہش داد. میزان 40-YKL در سلول‌های دریافت‌کننده لوراتادین 4470 پیکوگرم بر میلی لیتر بوده درحالی که در گروه کنترل 8700 پیکوگرم بر میلی لیتر برآورد شد ( $P \leq 0.05$ ). البته در سلول‌هایی که ابتدا با آلوئولار تحریک شدند و سپس لوراتادین دریافت کردند، کاهش میزان 40-YKL دیده شد. نتایج آزمایش نوتال رد هم نشان داد که تیمارها و سایر عوامل اثر توکسیک بر سلول‌ها نداشتند.

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

**واژگان کلیدی:** آلوئولار، لوراتادین، شبه کیتیناز 40-YKL

### مقدمه:

خانواده از این پروتئین‌ها در انسان و موش شناسایی شده است(۳-۶) اما فقط کیتینازها و پروتئین‌های شبه کیتیناز (CLPs) متعلق به خانواده حفاظت شده‌ای 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(۷). تا کنون بیش از هفت

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

باید اضافه می‌شد.

### تحریک (عصاره مایت) و تیمار(لوراتادین) سلول‌ها

سلول‌های A549 و THP-1 به صورت جداگانه به تعداد  $10^4$  cell/well  $\times 2$  به 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  $\text{CO}_2$  و رطوبت اشباع انکوبه شدند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، سوپرناتانت کشت سلولی جمع آوری شد. به گروه تست ۲۰۰ میکرولیتر محیط حاوی  $5/\mu\text{g}$  mL لوراتادین و به گروه‌های کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محیط فاقد لوراتادین اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سوپرناتانت گروه‌ها جمع آوری و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط حاوی  $500/\mu\text{g}$  mL عصاره مایت اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گروه انکوبه شدند و پس از پایان زمان انکوباسیون سوپرناتانت تمام گروه‌ها جمع آوری و در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش الیزا نگهداری شد و سلول‌ها نیز وارد آزمایش نوتراول رد شدند.

در حالت تیمار متعاقب تحریک (Post-treatment) سلول‌ها ابتدا با  $500/\mu\text{g}$  mL عصاره مایت تحریک شده و سپس با  $5/\mu\text{g}$  mL لوراتادین تیمار شدند.

### آزمایش نوتراول رد

بقای سلولی بر اساس توانایی سلول‌های زنده در جذب و نگهداری رنگ حیاتی نوتراول رد، در درون لیزوزوم‌ها مطابق با پروتکل رایج (۳۰) سنجیده شد. به این ترتیب که ابتدا یک محلول استوک نوتراول رد با غلظت  $4\text{ mg/ml}$  تهیه شد. سپس از این محلول غلظت  $1/\mu\text{g}/\text{ml}$  در محیط کشت تهیه شد. صد میکرولیتر محیط کشت حاوی نوتراول 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 نوتراول رد تخلیه شده و با  $150/\mu\text{g}$  mL میکرولیتر PBS به ازای هر چاهک شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک  $150/\mu\text{g}$  mL میکرولیتر حلال (۵ درصد اتانول  $40^\circ\text{C}$ ) درصد آب  $540/\mu\text{g}$  mL دیوینیز و یک درصد اسید استیکی 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 ۴۰ YKL در سوپرناتانت کشت‌های سلولی با استفاده از کیت شرکت R&D Systems (USA) مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام شد. از نمونه سرم مبتلاهایan به سلطان سینه نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به اختصار اینکه ابتدا آنتی بادی خد YKL-40 در کف پلیت الیزا کوت شد و پس از بلاکینگ، سوپرناتانت کشت سلولی و استانداردها اضافه شدند و پس از انکوباسیون، آنتی بادی بیوتیلینه ضد YKL و درنهایت استریتو-اویدین کونتوگه با پراکسیداز اضافه شد و با کمک سوستراتی TMB فرآیند الیزا ادامه یافت. واکنش رنگ‌زایی با استفاده از اسید سولفوریک متوقف شد و در طول موج  $450\text{ nm}$  نانومتر جذب نوری مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت این کیت  $31\text{ p}\mu\text{g}/\text{mL}$  بر میلی لیتر خود است.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شدند. برای انجام محاسبه‌های آماری از نرمافزار SPSS 16 Man-Witny U میاندار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### نتیجه آزمایش نوتراول رد

از آزمایش نوتراول رد برای ارزیابی اثر توکسیک لوراتادین ( $0.5/\mu\text{g}/\text{mL}$ ) و عصاره مایت ( $500/\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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 حرکت‌ها برای سلول‌های  $A549$  در طول مدت زمان کشت و مواجهه، کشند نیستند و همواره بیش از ۶۰ درصد سلول‌ها زنده هستند. بررسی‌های میکروسکوپی هم نشان داد که سلول‌ها از نظر متابولیک فعل بوده و قادر به جذب رنگ حیاتی نوتراول رد هستند (تصویر ۱).

علاوه بر دومن متصل شونده به کیتین، دارای یک دومن فعل آنزیمی نیز هستند و پیوندهای گلیکوزیدی  $\beta-1,4$  موجود در کیتین را هیدرولیز می‌کنند. به رغم آنکه سوبسترای اندوئن 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 (۱۲-۲۹). شبه کیتیناز ۴۰-YKL 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 (۹,۱۵-۲۰). از جمله اینکه مطالعه‌های مختلفی نشان دادند که بین سطوح سرمی بالای YKL-40 و بیماری‌های آریزیک ارتباط وجود دارد (۲۱,۲۲). مطالعه سطوح سرمی YKL-40 در بیماران مبتلا به آسم نشان داده است که افزایش سطوح سرمی YKL-40 با شدت بیماری، تغییر شکل راه‌های هوایی<sup>۱</sup> و کاهش عملکرد ریه ارتباط دارد (۲۳). از این رو محققان، نن CH3L1 را به عنوان یک نن مستعد کننده برای آسم و کاهش عملکرد ریه گزارش کردند (۲۴). مطالعه‌های نشان دادند که این شبه کیتیناز حداقل بخشی از آثار التهاب زای خود را از طریق مهار آپلتوز سلول‌های التهابی انجام می‌دهد.

لوراتادین یکی از آنتی هیستامین‌های شناخته شده است. تحقیقات مختلف نشان داده است که این دارو آثار ضد التهابی نیز دارد (۲۵-۲۸). در این تحقیق برای تعیین اثر ضد التهابی لوراتادین، تاثیر این دارو بر تولید ۴۰-YKL از سلول‌های اپیتلیالی و منوسیتی آریزیابی شد. این مطالعه در سال ۱۳۹۶ مطالعه‌ای داشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

### مواد و روش‌ها:

نوع مطالعه: این مطالعه از نوع تجربی است.

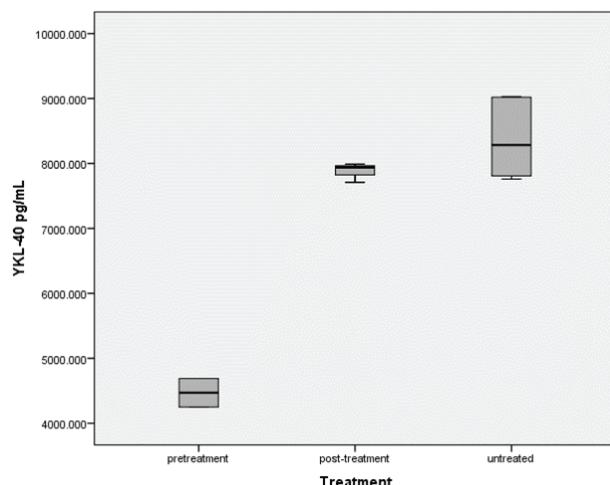
محرك‌ها و غلظت مورد استفاده از آنها

عصاره مایت از آزمایشگاه GREER (Lenoir, North Carolina, USA) و غلظت  $500/\mu\text{g}/\text{ml}$  از آن در محیط کشت RPMI 1640 پس از انجام خریداری 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 میلی گرم در میلی لیتر DMSO تهیه شد و غلظت  $5/\mu\text{g}/\text{mL}$ . در محیط کشت Dose Finding RPMI 1640 بر اساس مطالعه‌های قبلی و مطالعه‌های 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  $89/\text{mL}$  میلی لیتر RPMI 1640،  $10/\text{mL}$  میلی لیتر FBS ، یک میلی لیتر محلول آنتی بیوتیک‌های پنیسیلین - G استریتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،  $5\text{ درصد } \text{CO}_2$  و رطوبت اشباع انجام شده و سطوح داخلی فلاکس با PBS استریل شست و شو داده شد، سپس یک میلی لیتر محلول تریپسین- ای. دی. تی. آ (۲۵ درصد) به فلاکس اضافه کرده و به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس و مشاهده جدا شدن آن‌ها پنج میلی لیتر محیط کامل به فلاکس اضافه کرده و به این ترتیب تریپسین رفیق و خشی شد. سپس سوسپانسیون سلولی در یک لوله فالکون  $15\text{ mL}$  میلی لیتری قرار گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دور  $1500\text{ rpm}$  در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه مایع رویی به رسوب سلولی یک میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه کرده و به کمک پیست پاستور سپسپانسیون سلولی یکنواختی حاصل آمد. با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی تریپسین بلو برای درصد زنده بودن سلول‌ها محاسبه شده و با استفاده از لام تیوار شمارش سلولی انجام شد و سپس سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی برای تحریک و تیمار توزیع شدند. فرآیند تکثیر رده منوسیتی-۱ THP-1 نیز به همین ترتیب انجام شد با این تفاوت که به محیط کشت این سلول‌ها همواره  $50\text{ mL}$  میلی مولار ۲-ME

مقدار YKL-40 در مایع رویی سلول‌های THP-1 در حالت Pre-treatment ۴۴۷۰ پیکوگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد که در مقایسه با کنترل منفی (۸۷۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر) تفاوت معناداری دارد ( $p \leq 0.05$ ). در حالی که مقدار YKL-40 در مایع رویی سلول‌های THP-1 در حالت Post-treatment ۷۷۸۰، پیکوگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد که با کنترل منفی (۸۰۳۰ پیکوگرم بر میلی لیتر) 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 (نمودار۳).



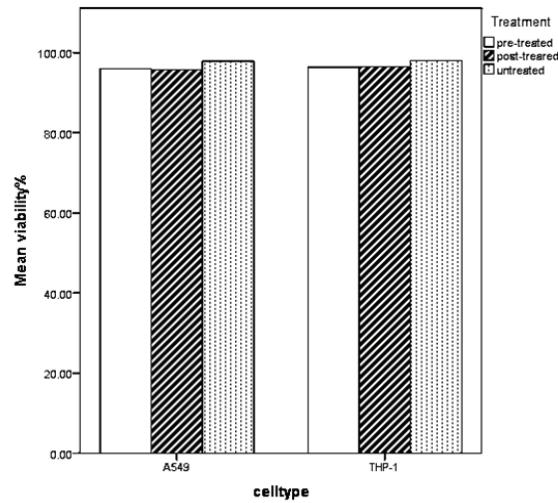
نمودار۳) مقایسه اثر لوراتادین بر تولید YKL-40 از سلول‌های THP-1 در شرایط پیش از تیمار و پس از تیمار با لوراتادین.

#### بحث و نتیجه‌گیری:

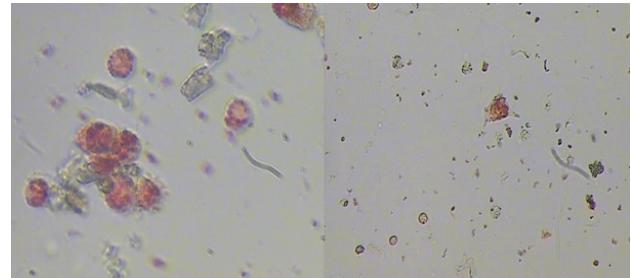
این مطالعه نشان داد که لوراتادین در غلظت  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  تولید شبه کیتیناز YKL-40 را از سلول‌های منوستیتی-I-THP در حالت پیش تیمار تضعیف می‌کند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های آلوئولار تیپ II ریه (A549) قادر به تولید و ترشح شبه کیتیناز-40 YKL-40 که از جمله مدیاتورهای اصلی در 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 میتلایان 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 زن 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 زن YKL-40 قادر به تولید محصول پروتئینی نبوده، بنابراین برای مطالعه‌های کیتینازها و شبه کیتینازها مدل مناسبی نیستند.

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

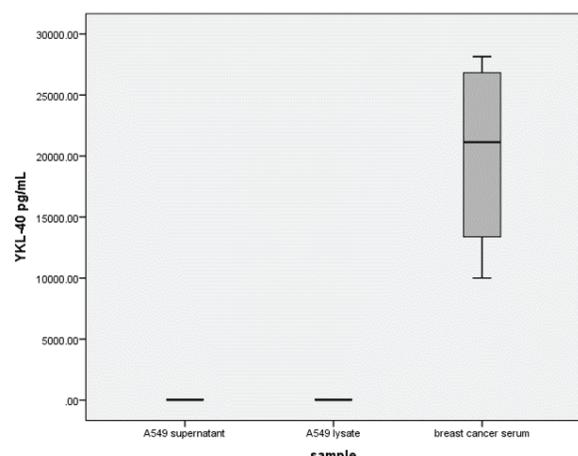


نمودار ۱) بررسی سایتوکسیسته محرك‌های معلوم با غلظت مشخص در پایان کشت ۷۲ ساعته سلول‌های A549 و THP-1.



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  $20 \pm 4$  YKL-40 پیکوگرم بر میلی لیتر برآورد شد، در حالی که در مایع رویی کشت سلولی و لایزیت میزان قابل تشخیصی از YKL-40 وجود نداشت (نمودار۲).



نمودار ۲) عدم تولید و ترشح YKL-40 در سلول‌های A549 در 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)

U Lippert و همکارانش در سال ۲۰۰۰ برای بررسی این فرضیه که آنتی هیستامین‌های H1 ترشح سایتوکاین‌ها را از ماست سل و بازوپل مهار می‌کنند، آثار چند آنتی هیستامین از جمله لوراتادین را بر ترشح ، IL-3 ، IL-6 ، GM-CSF و IL-8 در مقایسه با دگرگاماتازون ارزیابی و گزارش کردند که تمام آنتی هیستامین‌های بررسی شده از جمله لوراتادین، به صورت وابسته به ذر، موجب مهار رهاسازی سایتوکاین‌های مذکور به جز GM-CSF از سلول‌های HMC-1 می‌شوند. آن‌ها حداکثر اثر لوراتادین را در غلظت ۱۰ M گزارش کردند(۲۵).

Alberto Papi و همکارانش در سال ۲۰۰۰ آثار لوراتادین و دزلوراتادین بر بیان ICAM-1 القا شده با رینووپیروس را مطالعه کردند(۲۶). به این منظور سلول‌های A549 و کشت اولیه سلول‌های اپیتلیال برونشی انسان را به مدت ۱۶ ساعت با غلظت‌های ۱/۱۰، میکرومول بر لیتر از لوراتادین و دزلوراتادین انکوبه و سپس به مدت هشت ساعت با رینووپیروس تیپ ۱۶ الوه کردند. آن‌ها گزارش کردند که لوراتادین و دزلوراتادین در تمام غلظت‌های بررسی شده به صورت وابسته به ذر همچنین هر دو دارو موجب مهار فعل شدن پرموتر ICAM-1 و فاکتور رونویسی NF-κB می‌شوند.

Cheng و همکارانش در سال ۲۰۰۵ آثار ضدالتهابی لوراتادین را در سلول‌های A549 مطالعه کردند. آن‌ها در ابتداء سلول‌های A549 را با غلظت یک میکرومول لوراتادین ۴/۰ (μg/ml) تیمار کردند و در نهایت به مدت هشت ساعت با یک تانوگرم بر میلی لیتر IL-1β تحریک و گزارش کردند که پیش تیمار با یک میکرومول لوراتادین سبب کاهش معنادار در رهاسازی GM-CSF القا شده با IL-1β در این شود اما پیش تیمار با یک میکرومول لوراتادین تاثیری بر کاهش ترشح IL-8 ندارد(۲۷).

یادآور می‌شود کاهش YKL-40 در مطالعه حاضر در غلظت ۰/۵ میکرومگم بر میلی لیتر دیده شد. این یافته‌ها از نقش لوراتادین در کاهش التهاب راه‌های هوایی از طریق تعدیل رهاسازی سایتوکاین‌های التهابی حمایت می‌کنند. از بررسی مطالعه‌های انجام گرفته روی آثار ضد التهابی داروی لوراتادین این نتایج حاصل می‌شود که اثر لوراتادین روی مارکرهای التهابی مختلف، متفاوت است و همچنین این آثار وابسته به دوز هستند به طوری که در دوزهای بالاتر آثار ضد التهابی بیشتری را اعمال می‌کند. اما نکته مهم توجه به غلظت پلاسمایی فیزیولوژیک این دارو است که در حدود ۰/۴-۰/۰ بوده(۲۷) و بنابراین آثاری که در این محدوده غلظت اعمال می‌شوند حائز اهمیت هستند. از این‌رو با توجه به این نکته و مطالعه‌های تعیین دوز ما در مطالعه خود غلظت ۰/۵ μg/ml را انتخاب و مشاهده کردیم که این دارو در این غلظت موجب تضعیف تولید شبه کیتیناز ۴۰-YKL از سلول‌های IL-1 در حالت پیش تیمار می‌شود. بنابراین این دارو علاوه بر آثار آنتی هیستامینی شاید دارای آثار ضد التهابی نیز است. همان طور که پیش تر اشاره شد ۴۰-YKL توسط انواع مختلفی از سلول‌ها بیان می‌شود و بین سطوح سرمی بالای آن و شرایط پاتولوژیک مختلف از جمله؛ التهاب مزمن(۱۷)، فیبروز کبدی(۱۸،۱۹) و بیماری‌های آرژیک(۲۰-۲۳) ارتباط معناداری وجود دارد. بنابراین ممکن است عواملی که بیان ۴۰-YKL را کاهش دهنده از بهبود و تعدیل شرایط پاتولوژیک ذکر شده موثر باشند و با توجه به مشاهده اثر ضد التهابی داروی لوراتادین در کاهش این شبه کیتیناز در مطالعه فعلی، انجام مطالعه‌های تکمیلی در زمینه امکان بررسی تجویز لوراتادین در این‌گونه بیماری‌ها پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی:

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی خانم زینب باقرنژادان بوده که با حمایت مالی دانشکده پژوهشی در قالب طرح پژوهشی شماره ۷۴۵۵ انجام شد. از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشکده پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صمیمانه سپاسگزاریم.

مطالعه‌های متعدد حاکی از تولید سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-6 و IL-8 در رده سلولی A549 در مواجهه با مایت گرد وغبار منزل هستند. از جمله مطالعه Emmanuelle Adam و همکارانش در سال ۲۰۰۵ حاکی از آن است که آرژن PAR2 موجود در عصاره مایت از طریق مکانیسم‌های غیروابسته به p3 از طریق مکانیسم‌های وابسته به PAR2 این اثر را اعمال می‌کند(۳۴).

همچنین رده A549 اغلب برای مطالعه‌های بررسی آثار توکسیک پارتیکل‌ها و مواد شیمیایی نیز استفاده می‌شود. به عنوان مثال، در بررسی آثار ذرات دیزل بر genotoxicity و مارکرهای التهابی(۳۵-۳۸)، بررسی پتانسیل التهابی مونوفلاتلات‌ها(۳۹)، تعیین آثار اتمسفر حاوی بنزن و تولوئن(۴۰)، بررسی آثار آرژندهای هوا(۴۱،۴۲) و تعیین آثار کوتاه مدت مواجهه سلول‌های ریه با بنزن(۴۳) از سلول‌های A549 به عنوان مدل برون تنی استفاده شده است. برغم آنکه شبه کیتیناز ۴۰-YKL در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از جمله؛ ماکروفاف، نوتوفیل، فیبروبلاست و سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی، مجازی و کولون بیان می‌شود(۱۲) در این مطالعه دریافتیم که سلول‌های A549 قادر به تولید و ترشح YKL-40 نیستند و بنابراین در تحقیق‌های مشابه مطالعه‌های فوق باید توجه داشت که امکان ارزیابی بیومارکر نوظهور YKL-40 وجود ندارد و به این نتیجه می‌رسیم که اساساً استفاده از سلول‌های A549 به تنها یک و در غیاب دیگر رده‌های سلولی کارآمد نیست و بنابراین پیشنهاد می‌شود از دو یا چند رده سلولی در مطالعه‌های برون تنی بررسی ارزیابی مواد اثربار در واکنش‌های آرژیک استفاده شود.

لوراتادین به عنوان یک آنتی هیستامین، آنتاگونیست گیرنده H1 است و در درمان بیماری‌های آرژیک به طور گسترده استفاده می‌شود(۲۷). گروهی از محققان معتقدند آنتی هیستامین‌ها از جمله لوراتادین دارای آثار ضد التهابی نیز هستند و از این طریق نیز اعمال اثر می‌کنند. تا قبل از مطالعه ما اثر آنتی هیستامین‌ها بر تولید شبه کیتیناز ۴۰-YKL ارزیابی نشده است و مطالعه‌هایی که به بررسی آثار ضد التهابی لوراتادین پرداخته‌اند، اثر این دارو را بر تولید مولکول‌های چسیندگی، کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های التهابی از جمله ، IL-6 ، GM-CSF و IL-8 ، لوکوتین، B4، sICAM-1 تحت تاثیر محرك‌های مختلف در سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های اپیتلیال تفسی ارزیابی کرده‌اند. گروه دیگر از مطالعه‌ها اثر آنتی هیستامین‌ها از آنتاگونیست گیرنده H1 را بر فعال‌سازی فاکتور رونویسی (NF-kB) (Nuclear Factor-kappa B) ارزیابی کرده‌اند. از جمله این مطالعه‌ها می‌توان به مطالعه Robert E. West و همکارانش در سال ۲۰۰۴ اشاره کرد(۲۸). آن‌ها به بررسی و مقایسه آثار آنتی هیستامین‌های دزلوراتادین، لوراتادین، ستیرینزین، پیریلامین و فکسوفنادین بر فعال‌سازی NF-kB در سلول‌های COS-7 پرداخته و نشان داده‌اند که این آنتی هیستامین‌ها فعالیت NF-k B را که یک واسطه مهم التهابی است، کاهش می‌دهند. Hasan Bayram و همکارانش در سال ۱۹۹۹ این فرضیه را آزمایش کردند که لوراتادین ممکن است التهاب راه‌های هوایی القا شده با آلتینده‌ها را تحت تاثیر قرار دهد و این اثر را از طریق تغییر در تولید و رهاسازی واسطه‌های التهابی از سلول‌های اپیتلیال اعمال کرد(۴۴). به این منظور آن‌ها سلول‌های اپیتلیال برونشی انسان را کشت دادند و این سلول‌ها را به مدت شش ساعت با NO2 و لوراتادین انکوبه کردند. آن‌ها گزارش کردند که NO2 سبب افزایش معنادار در رهاسازی sICAM-1 و IL-8 و RANTES در مقایسه با کنترل می‌شود و افزایش القا شده با NO2 در تولید هر سه مدیاتور مذکور توسط غلظت ۲/۵ میکرومول بر لیتر لوراتادین به طور معنادار کاهش می‌یابد و همچنین غلظت ۲/۵ میکرومول (۱μg/ml) آن نیز موجب کاهش ICAM-1 و RANTES می‌شود اما اثری بر IL-8 ندارد.

## 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-lysiewska 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. 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, Kłapiszewski Ł, Wysokowski M, Norman M, Kołodziejczak-Bradzimska 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 b -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- Î 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.