

مقایسه اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل‌های کیتین با میکروپارتیکل‌های کیتوسان بر سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش های آلوده به انگل لیشمانیا ماژور

مریم مرادی^۱، محمد حسین علی‌محمدیان^۲، فرشید یگانه^۱، وحید خاضع شاهگلی^۲، مصطفی حاجی ملا حسینی^{۱*}

^۱ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
^۲ بخش ایمونولوژی، انبستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: در مورد خواص تعدیل ایمنی کیتین در مقایسه با کیتوسان تناقضاتی وجود دارد. برای پاسخ به این تناقضات، تاثیر میکروپارتیکل‌های کیتین را در مقایسه با میکروپارتیکل‌های کیتوسان بر تحریک سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل لیشمانیا مورد مطالعه قرار دادیم.

روش بررسی: در این تحقیق که به روش تجربی انجام پذیرفت، موش های Balb/c با $10^5 \times 2$ پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در فاز ایستایی، در قاعده دم و به طریقه داخل جلدی آلوده شدند و پس از دوهفته با روش PCR آلودگی موش‌ها تأیید گردید. سپس سوسپانسیون سلولی آلوده به لیشمانیا از غدد لنفی موش‌ها جدا شد. از میکروپارتیکل‌های کیتین که با سونیکاسیون و عبور دادن از صافی تهیه شده بودند و اندازه آنها با Master sizer بررسی شده بود، برای تحریک سلولی استفاده گردید. در نهایت غلظت سایتوکاین های $TNF-\alpha$ و $IL-10$ به روش الایزا در سوپرناتانت کشت سلولی اندازه گیری شد.

یافته‌ها: تحریک با میکروپارتیکل‌های کیتین افزایش معنی‌دار تولید $TNF-\alpha$ و همچنین $IL-10$ را در مقایسه با کیتوسان نشان داد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که میکروپارتیکل‌های کیتین قادر به تحریک تولید $TNF-\alpha$ و $IL-10$ در سوسپانسیون سلولی آلوده به لیشمانیا باشند و احتمالاً بتوان از آن به عنوان یک ایمونومولتور در واکنش‌های سوسپانسیون و یا درمان ضایعات لیشمانیایی بهره گرفت. **واژگان کلیدی:** کیتین، لیشمانیا ماژور، سایتوکاین.

مقدمه

ضد توموری، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که کیتین و مشتقات آن همچون کیتوسان - کربوکسی متیل کتین و دی هیدروکسی پروپیل کیتین دارای اثرات تعدیل ایمنی (ایمونومولتوری) هستند و با تاثیر بر ایمنی ذاتی و اکتسابی سبب افزایش فعالیت سلول‌ها، ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها می‌شوند. با توجه به اینکه کیتین و مشتقات آن در ساختار بدن انسان وجود ندارد، حضور آن برای سیستم ایمنی یک فعال کننده سیستم ایمنی محسوب می‌شود و در سطح سلول‌های ایمنی

کیتین پس از سلولز فراوان‌ترین بیوپلیمر موجود در طبیعت است که فرمول آن (β -1-4-poly-N-acetyl D glucosamine) است. کیتین و مشتقات آن به دلیل دارا بودن خواص بیولوژیکی مفید مانند سازگاری زیستی (Biocompatibility)، قابلیت تجزیه زیستی (Biodegradability)، خواص التیامی در زخم، خاصیت

آدرس نویسنده مسئول: تهران، استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مصطفی حاجی ملا حسینی (e-mail: m.mollahoseni@smbu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۸/۲۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۶

انگل لیشمانیا دارای مراحل مختلف رشد می‌باشد و قدرت عفونت‌زایی آن در مراحل مختلف متفاوت است. پروماستیگوت های انگل که در مرحله ایستایی قرار دارند، دارای بیشترین قدرت عفونت‌زایی هستند. به همین علت از پروماستیگوت های انگل (سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER) که در مرحله ایستایی قرار داشتند، سوسپانسیون انگلی به تعداد $10^5 \times 2$ در 100 میکرولیتر بافر تهیه در قاعده دم موش های Balb/c ماده با سن ۵ تا ۷ هفته و به صورت داخل جلدی تزریق شد.

انجام آزمایش PCR

در ابتدا با استفاده از نرم افزار Beacon Designer پرایمر رفت $3'$ -TGGTGGACATCATCAAGT-5 و پرایمر برگشت $3'$ -AGAAGAAGTCGTGGTTGTA-5 با هدف قرار دادن ژن SODB1 موجود روی کروموزوم ۳۲ انگل طراحی شد تا قطعه‌ای متشکل از ۷۵ جفت باز متعاقب PCR حاصل شود. به منظور راه‌اندازی روش و همچنین به عنوان دستیابی به کنترل مثبت ابتدا DNA پنج میلیون پروماستیگوت انگل با استفاده از کیت GeNet Bio, Korean مطابق دستور العمل استخراج شد و مراحل PCR با استفاده از $12/5$ میکرولیتر ملزومات واکنش و 10 پیکومول از هریک از پرایمر به علاوه 5 میکرولیتر DNA و $5/5$ میکرولیتر آب عاری از DNase و RNase در چرخه دمایی 10 دقیقه 95 درجه به علاوه 40 سیکل 95 درجه مدت 30 ثانیه - 55 درجه 30 ثانیه - 72 درجه 60 ثانیه با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 6000 صورت پذیرفت. محصول PCR با استفاده از روش الکتروفورز در آگاروز 2 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

موش‌های آزمایشگاهی ۲ هفته بعد از تلقیح انگل به روش جابه جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و گره‌های لنفاوی اینگوئینال چپ و راست آنها خارج شده و بعد از یکنواخت کردن آنها، سلول‌ها شستشو داده شمارش سلولی با لام نئوبار انجام و درصد زنده بودن سلول‌ها با رنگ تریپان بلو مشخص شد. آزمایش PCR برای اثبات آلوده بودن موش‌ها روی سوسپانسیون سلولی غدد لنفی در حضور کنترل مثبت و منفی صورت پذیرفت.

انجام آزمایش ELISA

به منظور تحریک تولید سایتوکاین‌های TNF- α و IL-10 توسط سلول‌های گره لنفاوی، 2 میلیون سلول گره لنفاوی در 1 میلی لیتر محیط کامل RPMI با غلظت 100 میکروگرم در 1 میلی لیتر میکروپارتیکل‌های کیتین و یا کیتوسان به مدت 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد CO_2 تحریک شد. اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت سلولی به

گیرنده‌هایی چون TLR-2، Detectin-1 و مانوز مسئول شناسایی آن می‌باشند (۲،۱).

در تحقیقات قبلی ما اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل‌های کیتین در موش‌های آلوده به انگل لیشمانیا به اثبات رسیده است و نتایج تحقیقات پیشین ما نشان می‌دهد که میکروپارتیکل‌های کیتین در شرایط in-Vitro باعث تحریک تولید TNF- α از ماکروفاژهای آلوده می‌شوند (۳) و همچنین در شرایط in-Vivo با فعال نمودن محور IFN- γ -IL10 یک پاسخ TH1 کنترل شده ایجاد می‌کنند که منجر به کنترل عفونت لیشمانیا در مدل موشی می‌گردد (نتایج منتشر نشده). با توجه به اینکه گزارشی وجود دارد که نشان می‌دهد در میان مشتقات مختلف کیتین مشتقات داستیله آن (کیتوسان) بهتر پاسخ‌های ایمنی را تحریک می‌کند (۴،۵) و برخی مطالعات نیز به پتانسیل متفاوت کیتین و کیتوسان بر القای پاسخ‌های ایمنی اشاره دارند، مانند مطالعه‌ای که بر نقش کیتوسان و نه کیتین در فعال کردن اینفلامازوم از راه فاگوسیتوز پرداخته است (۶). در این مطالعه بر آن شدیم که در یک بررسی اولیه تاثیر میکروپارتیکل‌های کیتوسان که خاصیت ادجوانتی دارد (C-3646, sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) را در مقایسه با میکروپارتیکل‌های کیتین (C-7170, sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) در توانایی تحریک سوسپانسیون سلولی غدد لنفاوی موش‌های آلوده به لیشمانیا با یکدیگر مقایسه نماییم تا به یک ایمونومودلاتور ایده آل و موثر بر کنترل عفونت لیشمانیا نزدیک شویم.

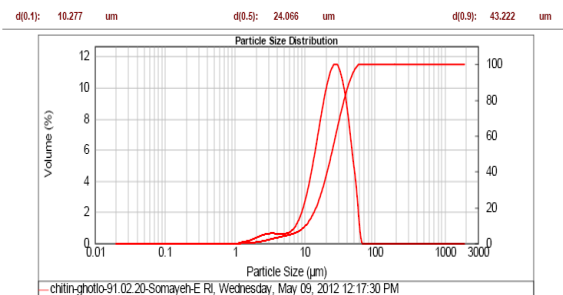
مواد و روشها

تهیه میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان

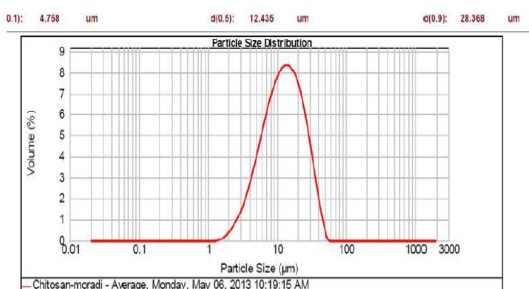
سوسپانسیون پودرهای کیتین و کیتوسان از صافی‌های با اندازه 40 ، 70 و 100 میکرون (Cell Strainer BD Falcon Mexico) عبور داده شد و سوسپانسیون زیر فیلتر 40 میکرون با استفاده از فریز درایر (Christ Alpha 1-2 LD, Uk) خشک شد. پودر حاصل وزن گردید از آن سوسپانسیونی تهیه شد. سپس سوسپانسیون حاصل در شرایط قدرت 25 درصد با استفاده از سیستم UP200H سونیکه شده اندازه ذرات به روش بهره‌گیری از لیزر (Malvern Master Sizer, Malvern Instruments Ltd, Worcester, UK) بررسی گردید. بدین ترتیب میکروپارتیکل‌های حاوی ذرات قابل فاگوسیتوز جهت تحریک سوسپانسیون سلولی غدد لنفاوی آماده شد.

آماده‌سازی و تزریق پروماستیگوت‌های انگل به موش

نمای میکروسکوپی رویت گردید که تائیدی دوباره بر نتایج مثبت PCR قلمداد گردید.

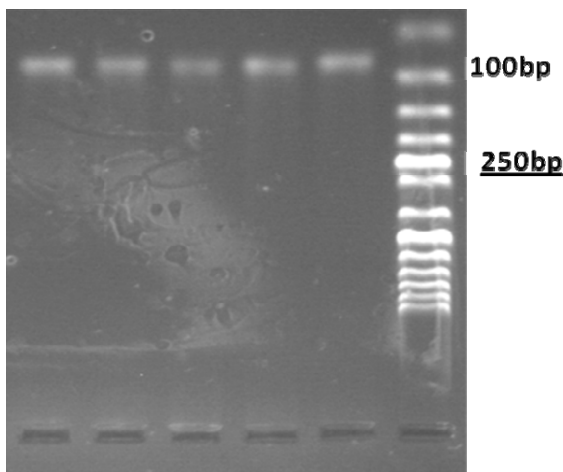


الف



ب

نمودار ۱. توزیع پراکنده‌گی اندازه پارتیکل‌های کیتین (الف) و کیتوسان (ب) بر حسب میکرومتر. میانگین اندازه ذرات میکروپارتیکل‌های تهیه شده کمتر از ۴۰ میکرون است.



شکل ۱. تکثیر قطعه ۷۵ جفت نوکلئوتیدی در سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا

تولید سایتوکاین توسط سوسپانسیون سلولی غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا

در پلیت ۲۴ خانه 2×10^6 سلول در ۱ میلی لیتر محیط کامل با میکروپارتیکل‌های کیتین و یا کیتوسان در حضور کنترل

روش ELISA با استفاده از کیت‌های تجاری (U-cyTech, Utrecht, The Netherlands) مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. حساسیت کیت TNF- α معادل ۲ پیکوگرم در میلی لیتر و حساسیت کیت IL-10 معادل ۴ پیکوگرم در میلی لیتر با محدوده اندازه گیری ۴-۲۵۶ پیکوگرم در میلی لیتر بود.

تحلیل آماری

برای تعیین نرمال یا غیر نرمال بودن توزیع داده‌های مربوط به متغیرها (IL-10&TNF- α) با استفاده از آزمون Shapiro ارزیابی آماری انجام پذیرفت. با توجه به اینکه در مورد هر دو سایتوکاین فقط داده‌های مربوط به گروه‌های تحریک شده با کیتین از توزیع نرمال برخوردار بود، لذا برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف از آزمون‌های ناپارامتری Mann-Whitney و K Independent Samples استفاده گردید و $p < 0.05$ مبنای معنی‌داری آماری تلقی گردید.

یافته‌ها

اندازه میکروپارتیکل‌های کیتین و کیتوسان

ارزیابی اندازه ذرات نشان داد که ۹۰ درصد میکروپارتیکل‌های کیتین موجود در سوسپانسیون دارای اندازه کمتر از ۴۳/۲ میکرون، پنجاه درصد ذرات دارای اندازه کمتر از ۲۴ میکرون و ده درصد ذرات کوچکتر از ۱۰/۲ میکرون بودند. در مقابل در سوسپانسیون میکروپارتیکل کیتوسان نود درصد ذرات اندازه کمتر از ۲۸/۴ میکرون و پنجاه درصد ذرات اندازه کمتر از ۱۲ میکرون داشتند. بنابراین هر دو نوع میکروپارتیکل حاوی ذرات قابل فاگوسیتوز بودند و سایز ذرات نیز کمتر از ۴۰ میکرون بود، لذا برای ادامه مطالعه مناسب تشخیص داده شدند (نمودار ۱).

آلودگی سوسپانسیون سلولی غدد لنفی با انگل لیشمانیا

در هفته دوم بعد از عفونت سوسپانسیون سلولی جدا شد و با توجه به اینکه در پایان دوهفته زخمی شکل نگرفته بود که نشانگر آلودگی موش‌ها باشد. با انجام آزمایش PCR روی سوسپانسیون سلولی آلودگی موش‌ها با انگل لیشمانیا اثبات شد و سپس سوسپانسیون سلولی موش‌های آلوده در آزمایش ارزیابی تولید سایتوکاین مورد استفاده قرار گرفت. حضور قطعه ۷۵ جفت بازی در الکتروفورز محصول PCR دلالت بر آلودگی موش با انگل لیشمانیا داشت (شکل ۱). لازم به ذکر است که پس از چند روز در کشت سلول‌های جدا شده نیز انگل در

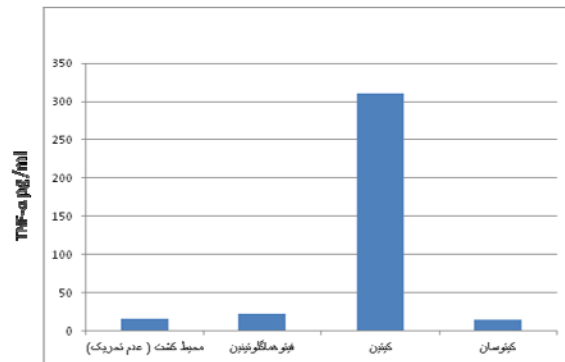
نشده (۸/۶±۶/۹) تفاوت معنی داری نداشت (p=۰/۴۳). همچنین در رتبه بندی میانگینها با روش کروسکال-والیس نتایجی به صورت زیر حاصل گردید:
 μ Control(20.50) > μ Chitosan(24.06) > PHA(44.77) > μ Chitin(56.57)

بحث

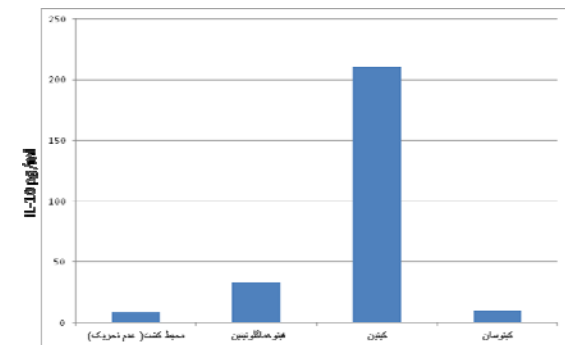
این تحقیق نشان داد که میکروپارتیکل های کیتین و نه کیتوسان توان تحریک سوسپانسیون سلول های غدد لنفی موش آلوده به لیشمانیا را دارند، به گونه ای که سوسپانسیون سلولی آلوده به انگل لیشمانیا در پاسخ به تحریک کیتین بیش از بیست برابر نسبت به کیتوسان تولید TNF- α و IL-10 را به دنبال دارد.

در سال ۲۰۰۳، Okawa به مقایسه اثرات کیتین و کیتوزان در موش های آلوده به باکتری سودوموناس اثر ژینوزا و موش های آلوده به لیستریا منوسایتوژنز پرداخت. نتایج این مطالعه حکایت از این داشت که درصد بقای (survival) موش های آلوده به سودوموناس در گروه تحت تیمار با کیتین ۶۰٪ و کیتوزان ۷۰٪ در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۲۶٪ است. همچنین در موش های آلوده به لیستریا منوسیتوژنز به عنوان یک باکتری داخل ساولی بر اثر تزریق داخل رگی کیتین ۹۰٪ و تزریق داخل رگی کیتوزان ۷۸٪ بقا را در مقایسه با ۲۲٪ بقا گروه کنترل گزارش نمودند و از تزریق داخل صفاقی کیتین بقا ۵۰٪ در مقایسه با گروه کنترل را گزارش نمودند و به این ترتیب خاصیت ضد باکتریایی هر دو ترکیب را نشان دادند (۷). اما در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Chelsea Bueter وهمکاران انجام شد و نتایج آن در مجله JBC منتشر گردید عنوان شده است که کیتوسان و نه کیتین سبب فعال شدن اینفلمازوم از طریق اثر گذاری بر فاگوسیتوز می شود (۶) و این در حالی است که مطالعات متعددی وجود دارد که اثر گذاری کیتین به عنوان یک تعدیل کننده پاسخ ایمنی را نشان داده اند. در سال ۲۰۱۱، Shibata که یکی از پیشگامان مطالعه اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل های کیتین است در پاسخ به تناقضاتی که پیرامون پاسخ های القا شده با میکروپارتیکل های کیتین وجود داشت، اثرات میکروپارتیکل های کیتین را در مقایسه با کیتوسان و میکروپارتیکل های دیگر به کار برد و نشان داد که میکروپارتیکل های کیتین بر خلاف کیتوسان قدرت تحریک ماکروفاژهای صفاقی موش را دارند (۸).

منفی و کنترل مثبت مورد تحریک قرار گرفتند و پس از ۷۲ ساعت سوپرناتانت کشت سلولی جمع آوری شد و از نظر تولید سایتوکاین ارزیابی به روش الیزا انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تولید سایتوکاین TNF- α توسط تحریک با میکروپارتیکل های کیتین ۳۱۰/۵±۲۵/۶ پیکوگرم در میلی لیتر است، در مقابل میکروپارتیکل کیتوسان ۱۳/۳±۴ پیکوگرم در میلی لیتر تولید این سایتوکاین را به دنبال داشته که بیانگر تفاوت میانگین TNF- α در پاسخ به هر یک از این محرک ها است (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۲).



نمودار ۲. میزان TNF- α تولید شده و موجود در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی موش آلوده به انگل لیشمانیا بر حسب محرک های مختلف



نمودار ۳. میزان IL-10 تولید شده و موجود در سوپرناتانت کشت سلولی غدد لنفی موش آلوده به انگل لیشمانیا بر حسب محرک های مختلف

مقایسه توان تحریک میکروپارتیکل ها در تولید IL-10 نشان داد که کیتین به صورت معنی داری (p<۰/۰۰۱) بیش از کیتوسان زمینه ساز تولید این سایتوکاین می گردد (نمودار ۳). غلظت IL-10 تولیدی در پاسخ به کیتین ۲۱۰/۵±۸۰/۱ برآورد شد، در حالی که این غلظت در پاسخ به کیتوسان معادل ۱۰/۲±۸/۵ بود که با سوسپانسیون سلولی تحریک

مواد منحصر به فردی می باشند که به طور همزمان خاصیت التهابی و ضد التهابی را دارا می باشند. این قابلیت کیتین سبب شده است که استفاده از آن در درمان مدل های موشی بیماری التهابی روده و بیماری های آلرژیک موثر افتد (۱۳-۱۱).

یافته های این تحقیق در تطابق با مجموعه مطالعاتی است که به سرپرستی Shibata صورت پذیرفته است و حکایت از این دارند که ذرات قابل فاگوسیتوز کیتین خاصیت ادجوانتی داشته سیستم ایمنی را تحریک می نماید (۱۷-۱۴) و برخلاف تحقیقاتی می باشد که کیتین را دارای اثر تحریکی بر سیستم ایمنی نمی دانند، به ویژه مطالعه ای که Bueterr و همکارانش انجام داده اند و معتقدند که فقط کیتوزان اثر تحریکی دارد (۱۸، ۶). در حال حاضر، مقایسه In-vivo میکروپارتیکل کیتین و کیتوسان به صورت تیمار موش های آلوده به انگل با میکروپارتیکل ها به منظور مطالعه زمان مرگ و میر موش ها و همچنین اثر بر میزان بار انگلی در حال انجام است و نتایج آن ضمن کمک به روشن تر شدن بحث های متناقض پیرامون اثرات تعدیل ایمنی کیتین و مشتقات آن، می تواند آغازگر تحقیقات پیرامون اثرات احتمالی ضد لیشمانیایی این گونه مواد باشد.

اینکه منشأ سلولی تولید سایتوکاین ها در سوسپانسیون سلولی تحریک شده در این پژوهش چه سلول هایی می باشند نیاز به تحقیق بیشتر دارد و هم اینکه آیا در تحریک سوسپانسیون سلولی سالم و غیر آلوده نیز میکروپارتیکل های کیتین و کیتوسان اثرات متفاوتی خواهند داشت. موضوعی است که می تواند مورد بررسی قرار گیرد. به هر حال از نتایج این مطالعه اولیه استنباط می شود که کیتین بیش از کیتوسان پتانسیل ایمونومدولاتوری در عفونت لیشمانیا را داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی خانم مریم مرادی بود که با حمایت مالی دانشکده پزشکی در قالب طرح پژوهشی شماره ۱۳/۲۷۰ صورت پذیرفت. از حمایت های معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صمیمانه سپاسگزاری می نماید.

تجارب قبلی ما نیز که اساس کار خود را میکروپارتیکل کیتینی با میانگین اندازه کمتر از ۴۰ میکرون قرار داده ایم حکایت از اثرات ایمونومدولاتوری کیتین دارد. در بررسی که در گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در ارتباط با اثرات تعدیل ایمنی میکروپارتیکل های کیتین در ماکروفاژهای آلوده به انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت و نتایج آن در مجله Archaic of Medical Research به چاپ رسید، ترشح TNF- α مشاهده گردید؛ علاوه بر این مشاهده گردید که میکروپارتیکل های کیتین باعث کاهش رشد انگل هم شده بودند (۳). در تحقیقی دیگری تاثیرات میکروپارتیکل های کیتین با اندازه کوچک تر از ۴۰ میکرون را بر پاسخ های Th1 و Th2 و همچنین میزان IL-10 و TNF- α ، در موش های Balb/c آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بررسی کردیم و همچنین تاثیرات آن در کنترل کردن بیماری، میزان بار انگلی و روند و اندازه ضایعه لیشمانیایی را نیز مورد بررسی قرار دادیم. در نهایت به این نتیجه رسیدیم که میکروپارتیکل های کیتین می توانند خواص ضد لیشمانیایی داشته باشند (نتایج منتشر نشده).

گروهی از محققین بر این عقیده هستند که ذرات کیتین با اندازه کمتر از ۴۰ میکرون باعث القای تولید IL-10 می شوند (۹) که نتایج ما از این منظر با یافته های آنان تطابق دارد. تجارب آزمایشگاهی ما این فرضیه را رقم زده است که میکروپارتیکل های کیتین با میانگین اندازه کمتر ۴۰ میکرون که در برگیرنده ذرات قابل فاگوسیتوز (کمتر از ۱۰ میکرون) توام با ذرات غیر قابل فاگوسیتوز کمتر از ۴۰ میکرون باشد، خواص ایمونومدولاتوری منحصر به فردی به منظور کنترل پاسخ های افسار گسیخته تیپ دو ایمونولوژیک نظیر التهاب های آلرژیک و ضایعات لیشمانیایی دارند. البته مطالعات با استفاده از پارتیکل هایی با اندازه های دیگر نیز باید صورت پذیرد تا این فرضیه به یک اصل علمی بدل گردد.

نقش IL-10 را در مقابله با ضایعات لیشمانیایی در متون علمی مطرح شده است (۱۰). تجارب آزمایشگاهی ما حکایت از این دارد که میکروپارتیکل های کیتین از طریق محور IFN-IL-10 از پاسخ های افسار گسیخته سیستم ایمنی که در ایمونوپاتولوژی زخم های لیشمانیایی دخالت دارد، جلوگیری کرده و از طرفی با فعال کردن ماکروفاژها کمک به حذف انگل می نماید. از این رو، می توان گفت میکروپارتیکل های کیتین

REFERENCES

1. Lee C, Da Silva C, Lee J, Hartl D, Elias J. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20:684-89.

2. Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *J Immunol* 2008 Sep 15;181(6):4279-86.
3. Fatemeh D, Hoseini Mostafa HM, Memarnejadian A, Yeganeh F, Rezaie AM, Khaze V, et al. Immunomodulatory activities of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected Murine macrophages. *Arch Med Res* 2011; 42:571-46.
4. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* 1984;2:93-99.
5. Nishimura S, Nishi N, Tokura S, Nishimura K, Azuma I. Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl) chitins. *Carbohydr Res* 1986;146:251-58.
6. Bueterr C, Lee C.K, Rathinam V, Healy G.J, Taron CH. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chemistr* 2011;286:35447-55.
7. Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki S, Suzuki M. Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice. *Biol Pharm Bull* 2003;26:902-904.
8. Kogiso M, Nishiyama A, Shinohara T, Nakamura M, Mizoguchi E, Misawa Y, et al. Chitin particles induce size-dependent but carbohydrate-independent innate eosinophilia. *J Leukoc Biol* 2011;90:167-76.
9. Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J Immunol* 2009; 182:3573-82.
10. Marincola FM, Ed. Interleukin -10. Texas: Landes Bioscience; 2006. p.107-24.
11. Strong P, Clark H, Reid K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulates symptoms of allergic hypersensitivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Aspergillus fumigatus* in murine models of allergy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1794-800.
12. Ozdemir C, Yazici D, Aydogan M, Akkoc T, Bahceci NN, Strong P, et al. Treatment with chitin microparticles is protective against lung histopathology in a murine asthma model. *Clin Exp Allergy* 2006;36:960-68.
13. Nagatani K, Wang S, Llado V, Lau CW, Li Z, Mizoguchi A, et al. Chitin microparticles for the control of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1698-710.
14. Shibata Y, Foster LA, Metzger WJ, Myrvik QN. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. *Infect Immun* 1997;65:1734-41.
15. Shibata Y, Foster LA, Bradfield JF, Myrvik QN. Oral administration of chitin down-regulates serum IgE levels and lung eosinophilia in the allergic mouse. *J Immunol* 2000;164:1314-21.
16. Shibata Y, Honda I, Justice JP, Van Scott MR, Nakamura RM, Myrvik QN. Th1 adjuvant N-acetyl-D-glucosamine polymer up-regulates Th1 immunity but down-regulates Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10-knockout and wild-type mice. *Infect Immun* 2001;69:6123-30.
17. Nishiyama A, Tsuji S, Yamashita M, Henriksen RA, Myrvik QN, Shibata Y. Phagocytosis of N-acetyl-D-glucosamine particles, a Th1 adjuvant, by RAW 264.7 cells results in MAPK activation and TNF-alpha, but not IL-10, production. *Cell Immunol* 2006;239:103-12.
18. Chen CL, Wang YM, Liu CF, Wang JY. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. *Biomaterials* 2008;29:2173-82.