

Assessing the gene expression of IL4, TNF α , TGF β and IFN γ in studying M1 and M2 macrophages derived from human monocyte

Arsalan Jalili¹, Elham Moslemi¹, Nariman Mosaffa²

1. Department of Biology School of Basic Science, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran Iran

2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

(Received: 2015/10/31 Accept: 2016/1/27)

Abstract

Background: Classical macrophages (M1) and alternative macrophages (M2) are responsible for various functions in order to maintain homeostasis. BCG vaccine and hydatid cyst fluid can be examples of stimulants, which can cause M1 and M2 macrophage polarization. Evaluating the expression of markers such as IFN γ and TNF α for M1 phenotype and TGF β and IL4 for M2 phenotype is one of the confirmatory ways of polarization. The purpose of this study is to verify the polarization of macrophages, which was induced by BCG vaccine and hydatid cyst fluid by studying the gene expression of aforementioned markers.

Methods: Using ficol 1077 and gradient concentration separated mononuclear normal human peripheral blood cells. Monocyte populations were separated by adhesion technique from cultured cells in complete tissue culture medium. Monocyte derived macrophages were treated by BCG intravesical vaccine and fertile hydatid cyst fluid for 8 hours. RT-PCR was performed to confirm the polarization. The expression of amplified genes was compared with control groups.

Results: Amplification of TNF α and IFN γ genes in M1, and TGF β and IL4 in M2 group confirmed the polarization procedure. Moreover, lack of PCR product in negative control samples indicates either the absence or a very low expression of this gene in control group.

Conclusion: The ability of these stimulants in macrophage polarization can be used in experimental studies. It is also possible to take advantage of this model to achieve useful goals in cell therapy and develop more efficient therapeutic methods in inflammatory diseases and cancer immunotherapy.

Keywords: Classical macrophages, Alternative macrophages, Polarization, BCG, Hydatid cyst fluid

• Corresponding Author: Dr. Elham Moslemi,
EMAIL: Elham_moslemi60@yahoo.com

بررسی بیان ژن های $IFN\gamma$ و $IL4$ ، $TNF\alpha$ ، $TGF\beta$ در تایید پلاریزاسیون ماکروفاژهای $M1$ و $M2$ حاصل از کشت مونوسیت های انسانی

ارسلان جلیلی^۱، دکتر الهام مسلمی*^۱، امیر ایزدی^۲، دکتر نریمان مصفا^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۳- گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۷

چکیده

مقدمه: ماکروفاژهای کلاسیک ($M1$) و آلترناتیو ($M2$) عملکردهای مختلفی را در مقابله با عفونت ها به عهده دارند. در جریان پاسخ ایمنی در مقابل BCG ماکروفاژهای $M1$ و در بیماری هیداتیدوز ماکروفاژهای $M2$ فعال می شوند. در مکانیسم های تنظیم ایمنی پلاریزاسیون این جمعیت اساس هوموستاز را تشکیل می دهد. یکی از راه های تایید پلاریزاسیون، بیان سایتوکاین های $IFN\gamma$ و $TNF\alpha$ برای فنوتیپ $M1$ و $TGF\beta$ جهت فنوتیپ $M2$ است. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن این سایتوکاین ها در جهت تایید پلاریزاسیون ماکروفاژهای تحریک شده با BCG و مایع کیست هیداتید بارور در شرایط آزمایشگاهی بوده است. بیان ژن $IL4$ که به تازگی تولید آن توسط رده منوسیتی ماکروفاژی گزارش شده است بررسی شد.

مواد و روش ها: تک هسته های خون محیطی باروش به کارگیری از گرایان غلظتی فایکول تخلیص و جداسازی شد. جمعیت منوسیتی - ماکروفاژی با تکنیک چسبندگی از سلول های شناور در محیط کامل کشت سلول تفکیک شد. به مدت هشت ساعت ماکروفاژها با محرک های BCG و مایع کیست هیداتید بارور تیمار شد. به منظور تایید پلاریزاسیون ماکروفاژی، بیان سایتوکاین های اختصاصی با استفاده از $RT-PCR$ و بررسی توالی تکثیر یافته، در مقایسه با نمونه کنترل مقایسه شد.

نتایج: تکثیر ژن های اختصاصی سایتوکاین های هر گروه نشان دهنده تایید فرآیند پلاریزاسیون بود. ماکروفاژهای با محرک BCG بیان افزایش داشته ای را از $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ نشان دادند. در گروه با تحریک مایع کیست بارور هیداتید بیان ژن $TGF-\beta$ مشهود بود. ژن $IL4$ نیز در این جمعیت ملاحظه شد. همچنین عدم مشاهده محصول PCR در نمونه کنترل نشان دهنده عدم یا بیان بسیار کم ژن مذکور در گروه کنترل است.

نتیجه گیری: توانایی BCG و مایع کیست هیداتید بارور در القای پلاریزاسیون ماکروفاژها می تواند در مطالعات تجربی مرتبط با تمایز ماکروفاژی استفاده شود. تاکید بر کارایی این روش ساده و کم هزینه در مقایسه با به کارگیری از تکنیک های پرهزینه تمایز ماکروفاژی نیاز به پژوهش های تکمیلی دارد.

واژگان کلیدی: پلاریزاسیون ماکروفاژ $M1$ ، $M2$ ، BCG ، مایع کیست بارور هیداتید

مقدمه

عملکرد با یکدیگر متفاوت هستند. (۵) با توجه به تاثیر پلاریزاسیون ماکروفاژها در روند کنترل یا پیشرفت بیماری های مرتبط با سیستم ایمنی مانند عفونت های میکروبی (۶)، اختلالات التهابی، بیماری های خودایمنی و همچنین تاثیر عوامل تحریکی مختلف در تکامل آن ها، بررسی و مطالعه پلاریزاسیون در شرایط آزمایشگاهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۷). ماکروفاژهایی که به صورت کلاسیک یا آلترناتیو فعال می شوند، سلول های اثرگذار ایمنی هستند و حجم زیادی لیمفوکین تولید می کنند (۸) و با بیان ژن هایی مانند $IFN\gamma$ ، $TNF\beta$ و $TNF\alpha$ همراه هستند. در فنوتیپ $M2$ تولید زیاد $TGF\beta$ ، $IL10$ ، نیز مشاهده می شود (۸) که ماکروفاژهای ضد التهابی هستند و عملکردهای تولرانس، تنظیم ایمنی و ترمیم بافت را ایفا می کنند (۹). در این فنوتیپ مقدار زیاد آنزیم آرژیناز و مقدار کم $IL12$ و $IL23$ تولید می شود (۱۰) همچنین قرارگیری در معرض $IL4$ یا $IL13$ ، کمپلکس های ایمنی و $IL10$ ماکروفاژهای $M2$ را از راه آلترناتیو فعال می کنند. (۱۰) هدف از این مطالعه بررسی

ایمنی ذاتی یکی از مهم ترین سدهای دفاعی مهره داران در برابر عوامل بیماری زا است. در سیستم ایمنی ذاتی مونوسیت ها و ماکروفاژها سلول هایی هستند که نقش کلیدی را ایفا می کنند. این سلول ها پاتوژن های خطرناک و مهاجم را در خون و بافت ها شناسایی کرده و یک واکنش التهابی ایمنی قوی را اعمال می کنند که در نهایت به پاکسازی پاتوژن و برقراری هموستازی بدن منجر می شود. (۱) در واکنش به پاتوژن ها، ماکروفاژها دچار تغییرهای فنوتیپی می شوند. این امر باعث می شود به شکل بهتری با محیط سازگار شوند. (۲ و ۳) ماکروفاژها فاگوسیت های ساکن در بافت و برداشت کننده آنتی ژن بوده که از سلول های شناور در خون تمایز پیدا می کنند. آن ها نقش مهمی در فعال سازی و همچنین تنظیم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می کنند. (۴ و ۵) ماکروفاژهای فعال شده به فنوتیپ های مختلف $M1$ و $M2$ تمایز پیدا می کنند. این فنوتیپ ها از لحاظ سایتوکاین ها، کموکاین ها، گیرنده های لیگاند و

نویسنده مسئول: دکتر الهام مسلمی

elham_moslemi60@yahoo.com

تومورهای انسانی مشاهده شده است. (۱۶) عملکرد BCG در روند القایی پلاریزاسیون ماکروفاژی که در بسیاری از تومورهابه فرم آلترناتیو، به سمت جمعیت M1، کاربردهای درمانی بسیار از جمله ایمونوتراپی تومورها گرایش دارد. (۱۷ و ۱۸)

BCG تراپی در کنترل بدخیمی‌های مثانه که فنوتیپ ماکروفاژ همراه تومور از نوع M2 است، سال‌هاست که کاربرد فراوانی دارد. در این موارد به دلیل اثر آدوانتی BCG علاوه بر پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت M1 شاهد افزایش تولید اینترفرون گاما توسط لنفوسیت‌های اطراف تومور هستیم. (۱۹) این محرک میکروبی می‌تواند در شرایط vivo In سلول‌های سیستم ماکروفاژی را به بیان ژن‌های موثر ایمنی سلولی مانند IFNγ و TNFα هدایت کرده و زمینه را برای مصنوعیت و دفاع حفاظتی علیه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس فراهم آورد.

در پاسخ دفاعی علیه ترشحات کیست هیداتید، تنظیم دفاع ماکروفاژی و پلاریزه شده جمعیت سلولی به سمت M1 یا M2 موجب تعیین سرنوشت دفاع میزبان علیه انگل آنکیسته شده مهاجم می‌شود. بنابراین مایع کیست هیداتید بارور می‌تواند به‌عنوان محرک موثر جمعیت ماکروفاژی به سمت پلاریزه شدن و تمایز به سوی مجموعه M2 شود. در استراتژی تهاجمی عفونت هیداتیدوز، لایه لامینه شده (LL) کیست مسئول برانگیختن فعالیت ضدالتهابی ماکروفاژهای M2 و به دنبال آن فعال‌سازی T لنفوسیت‌های تنظیمی (Treg) است. در این صورت است که به پاسخ‌های حفاظتی حاصله از مجموعه سلول‌های M1/Th1/Th2 به‌شدت صدمه می‌زند و نتیجه به رهایی انگل یاری می‌رساند. از سویی گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که فاکتورهای LL تاثیر شدیدی بر افزایش تولید IL10, TGF-β و همچنین کاهش تولید NO, iNOS توسط ماکروفاژها داشته و واجد اثر قوی ضد التهابی است. جالب است که از این خاصیت غشاء کیست برای درمان مدل تجربی بیماری التهاب روده‌ای (IBD) استفاده شده است (۱۹). سایر تجربیات آزمایشگاهی نیز موارد فوق را تایید کرده‌اند. لایه لامینه شده کیست هیداتید در تحریک ماکروفاژهای موشی در کشت ۷۲ ساعت به ترشح سیتوکاین TGF-β، آنزیم آرژینیناز و اودار شده و فعالیت NOS در آن‌ها کاهش یافته است. سه مورد فوق اصلی‌ترین مارکرهای پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت جمعیت M2 یا آلترناتیو است. (۲۰)

در عفونت و ضایعات لپروماتوز لپروسی تجمع ماکروفاژهای M2 در مقایسه با فرم توبرکولوزیدی چشمگیر است. در این رابطه محققان با تغییر الگوی بیان ژنی جمعیت ماکروفاژی بیماران از طریق مجاورت با BCG موفق به ارتقای سطح ایمنی علیه مایکوباکتریوم لپره از طریق پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت M1 و افزایش تولید IFN-γ شدند. (۲۱)

Michel J Davis و Tiffany M در سال ۲۰۱۳ سیتوکاین IFNγ و INOS را در عفونت حاصل از Cryptococcus Neoformous و ماکروفاژها را بررسی و طی این آزمایش از تکنیک‌های کشت سلول، الیزا، فلوسایتومتری، Real Time PCR و Immuno Florescence استفاده کردند. آن‌ها دریافتند که برتری فنوتیپ M1 موجب محدود شدن عفونت و در صورت غلبه نوع M2 شاهد وخیم‌تر شدن و گسترش عفونت چارچی در مبتلایان می‌شود. (۲۲)

در جریان فعالیت پاسخ‌های دفاعی مرتبط با Th2 تولید IL4 موجب تمایز سلول‌های ماکروفاژی به سمت فنوتیپ M2 می‌شود به طوری که موجب تقویت و حمایت لنفوسیت‌های Th2 شده و وقایع ضدالتهابی را در یک مسیر تنظیمی القا می‌کند. در تجربه‌ای که روی مدل‌های موشی به انجام رساندند ثابت کردند که ماکروفاژهای M2 نیز در یک روند دفاعی ذاتی می‌توانند IL4 تولید کنند و در شکل‌گیری مسیر دفاع اختصاصی و تقویت آن نقش داشته باشند (۲۳) هرچند تحقیقات دیگری نیز نشان داده که ماکروفاژهای تیپ ۲ در جریان پاکسازی قطعات نوتروفیل‌های آپتوتیک به تولید و ترشح IL4 می‌پردازند (۲۴) سایر گزارش‌ها نیز توانمندی سلول‌های ماکروفاژی در پاسخ به محرک‌هایی مانند LPS را به اثبات رساندند. (۲۵) ماکروفاژهای آلوتولار انسانی جدا شده از مایع برونکوالوتولار در پاسخ به محرک‌های میکروبی واجد بیان افزایش یافته در mRNA سیتوکاین IL4 شده‌اند. این توانایی بخشی از دفاع ذاتی دستگاه تنفس را تشکیل می‌دهد. همچنین

بیان ژن مربوط به سایتوکاین‌های اختصاصی IL4، TGFβ، TNFα و IFNγ در ماکروفاژهای حاصله بررسی شد. بیان IFNγ و TNFα تاییدکننده پلاریزاسیون به سمت فنوتیپ M1 و TGFβ و IL4 تاییدکننده تشکیل ماکروفاژ M2 است. نتایج حاصله در جدول و شکل شماره یک قابل مشاهده هستند.

نمونه‌ها	ماکروفاژ آلترناتیو	ماکروفاژ کلاسیک	کنترل ماکروفاژی	کنترل منفی
TGFβ	+	-	+	-
IFNγ	-	+	+	-
IL4	+	-	+	-
TNFα	-	+	+	-

شکل ۱: تصاویر شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان دهنده تکثیر ژن‌های سایتوکاین‌های IFNγ، TGFβ، IL4، TNFα و TNFα در نمونه‌های تحریک شده با کیست هیداتید بارور و واکسن BCG، کنترل مثبت و کنترل منفی می‌باشد که در تصویر شماره یک مربوط به IFNγ، SM.۱، ۲. محصول ماکروفاژ کلاسیک ۳۱۵ bp کنترل منفی ۴. محصول ماکروفاژ آلترناتیو، در تصویر شماره دو مربوط به TGFβ SM.۱ ۲. محصول ماکروفاژ آلترناتیو ۹۵ bp، ۳. کنترل منفی ۴. محصول ماکروفاژ کلاسیک، تصویر شماره سه مربوط به IL4، ۱. کنترل مثبت، ۲. محصول ماکروفاژ آلترناتیو ۳۲۳bp کنترل منفی، ۴. محصول ماکروفاژ کلاسیک و تصویر شماره چهار مربوط به TNFα، ۱. کنترل مثبت، ۲. محصول ماکروفاژ کلاسیک ۳۲۵bp کنترل منفی، ۴. محصول ماکروفاژ آلترناتیو می‌باشد

بحث

پاسخ دفاع سلولی در مواجهه با پاتوژن‌های داخل سلولی، همواره با عملکرد اجرایی و اثر سلول‌های سیستم ماکروفاژی همراه است. از بین گروه‌های مختلف سلول‌های ماکروفاژی که در تمامی بافت‌ها و ارگان‌های بدن پراکنده‌اند، گروه‌های M1 با حضور و گسترش وسیع در محل، با تولید و ترشح مدیاتورهای موثر و سایتوکاین‌های اجرایی، به سرکوب و تجمع پاتوژن‌های مهاجم منتهی شده که نتیجه آن رهایی میزبان از حمله میکروب و از سوی دیگر وقوع واکنش ازدیاد حساسیت است. (۱۳) پاسخ‌های دفاعی ضد پاتوژن‌های داخل سلولی بنا بردلایلی از جمله نوع میکروب، گونه اختصاصی، ژنتیک میزبان و برخی شرایط محیطی مانند تغذیه و استرس سمت‌وسویی دیگر یافته‌ودر صورت پلاریزه شدن سلول‌های سیستم ماکروفاژی به‌طرف ماکروفاژهای M2، منجر به رهایی پاتوژن و در عوض شکست میزبان می‌شود. ماکروفاژهای M2 با تولید سایتوکاین‌های تعدیل‌کننده و سرکوب‌کننده وقایع دفاعی مانند مسیر TGFβ پاسخ ضد میکروبی را به سمت ایمنی هومورال کشانیده و با توقف مکانیسم کشندگی داخل سلولی، در مقابل به تولید و ترشح مدیاتورهای بازسازی و ترمیم بافت هدایت می‌شود که حاصل آن بقای عفونت است (۱۴). هر چند که چنین پاسخ‌های ضدالتهابی، لازمه بسیاری از واکنش‌های ازدیاد حساسیت است اما در برخی موارد نیز می‌تواند مفید و به نفع میزبان قلمداد شود. جمعیت متفاوت ماکروفاژی در شرایط عفونت و ازدیاد حساسیت، سرنوشت میزبان را تعیین می‌کنند. این امر می‌تواند بیان‌کننده امکان استفاده از ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی، به نفع میزبان و کاربرد آنها در ایمونوتراپی باشد (۱۵) باسپیل کالمت گرین (BCG) از دیرباز به‌عنوان یک یاری‌دهنده قوی ایمنی سلولی، نه تنها برای مبارزه با گسترش بیماری سل، بلکه به‌عنوان یک محرک قوی ایمنی سلولی و سیستم ماکروفاژی نیز کارایی داشته و استفاده از آن در چندین نمونه از

مختلف ماکروفاژی در عفونت، فاگوسیتوز و حذف سلول‌های آسیب دیده و پیر، همچنین نقش آنها در توقف رشد و تحریک تمایز سلول‌ها، امکان پلاریزاسیون آن‌ها در آزمایشگاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که امکان پلاریزاسیون سلول‌های سیستم ماکروفاژی در شرایط کشت سلولی آزمایشگاهی به کمک محرک‌های مورد نظر فراهم می‌شود. از آنجا که دسترسی و تهیه کیت تخصصی پلاریزاسیون ماکروفاژی بسیار پرهزینه است شاید بررسی‌های تکمیلی از جمله طولانی کردن زمان کشت و انکوباسیون سلول‌های مونوسیتی ماکروفاژی انسانی و نیز اندازه‌گیری سیتوکاین‌های مربوطه و ارزیابی سایر پروفایل‌های مولکولی در مجموعه‌های حاصل از کشت دلایل محکم و مستدلی در کارایی این روش ساده و کم هزینه به دست آورد.

منابع

1. Biswas, Subhra K. , ManeshC hittezath, Irina N. Shalova, and Jyue. Yuan Lim. "Macrophage polarization and plasticity in health and disease." *Immunologic research* 2012; 53: 11-24.
2. Biswas, Subhra K. , and Alberto Mantovani. "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 2010; 10(11): 889-896.
3. Stout, Robert D. , and Jill Suttles. "Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments." *Journal of leukocyte biology* 2004; 3(79): 509-513
4. Mantovani, Alberto, Antonio Sica, and Massimo Locati. "Macrophage polarization comes of age." *Immunity* 2005; 4(23): 344-346.
5. Mantovani, Alberto, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunziata Vecchi, and Massimo Locati. "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends in immunology* 2004; 12(25): 677-686.
6. Benoit, Marie, Benoît Desnues, and Jean-Louis Mege. "Macrophage polarization in bacterial infections." *The Journal of Immunology* 2008; 181(6): 3733-3739.
7. Mia, Sohel, Andreas Warnecke, X-M. Zhang, Vivianne Malmström, and Robert A. Harris. "An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype." *Scandinavian journal of immunology* 2014; 79(5): 305-314.
8. Martinez, Fernando O and Siamon Gordon. "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. 2014; (6): 11-22
9. Murray, Peter J., and Thomas A. Wynn. "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11(11): 723-737.
10. Sica Antonio, and Alberto Mantovani. "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122(3): 787-795.
11. PromoCell GmbH. Differentiation of M1- or M2-Macrophages from PBMC . 3: Protocol overview using PromoCell M1-/M2-Macrophage Generation Medium DXF-10 PromoCell GmbH. Sickingenstr. 63/65. 69126 Heidelberg. Germany
12. Mihai G. Netea*, Reinout van Crevel. BCG-induced protection: Effects on innate immune memory *Seminars in Immunology* 2014; (26): 512-517.
13. Charles Dudley Miles, *Anatomy of a discovery: M1 M2 macrophages*". *Frontiers in immunology* 2015; (6): Article212.
14. Keneth Morphy "Janaway Immunology" 2012 , 8th edition. Garland Science ,Taylor&Francis group. LLC. Page: 37-73
15. Daniela Filipa Dias Oliveira Macrophages as biomarkers in BCG treatment response in bladder cancer *Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde* Setembro de 2013 Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto Instituto Politécnico do Porto.
16. Najeeha Talat Iqbal, Rabia Hussain bNon-specific immunity of BCG vaccine: A perspective of BCG immunotherapy *Trial .Vaccinology* 2014; (2):143-149
17. Manel Amri1 and Chafi Touil-Boukoffa1 Involvement of Treg and alternatively activated macrophages in invasion strategies during hydatidosis . *frontiersin*. 2013; (2): 425/event
18. Imene Soufli, Ryma Toumi, Hayet Rafa, Manel Amri, Moussa Labsi, Lila Khelifi, Ferdinando Nicoletti and Chafia Touil-Boukoffa Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice . *Journal of Inflammation* 2015; (12): 19-27
19. Manel Amri, Chafia Touil-Boukoffa A protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase . *Acta Tropica*. 2015; 186-194.
20. Manel Amri , Touilboukoffa Chafia. Impairment of TH1/TH17 host protective responses by macrophages alternative activation as a mechanism for helminth survival. *Cytokine* 2012; 59 (3): 523-39
21. Ricardo Lardone, Yi Guo, Seema Plaisier, Babu Singh, Rosane Teles, Robert Modlin, Peter Sieling, and Delphine Lee, BCG-treated M2-macrophages enhance IFN production of T cells . *The Journal of Immunology* 2013; (190): 134-49
22. Davis, Michael J. , Tiffany M. Tsang, Yafeng Qiu, Jeremy K. Dayrit, Joudeh B. Freij, Gary B. Huffnagle, and Michal A. Olszewski. "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection." *M Bio* 2013;(4): 264-73.
23. Anne Camille La Flamme, Marie Kharkrang, Sarrabeth Stone, Sara Mirmoeini, Delgertsetseg Chuluundorj, Ryan Kyle, Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4. *PLOS ONE* 2012 (7) : 469-89
24. Melody Zeng, Duy Pham, IRandy Brutkiewicz, Mark Kaplan, and Mary Dinauer, Efferocytosis induces macrophages to produce IL-10 and activate invariant NKT cells to suppress inflammation . *The Journal of Immunology* 2012; (188): 117-27
25. Sumanta Mukherjee, Ling-Yu Chen, Thomas J. Papadimos, Shuang Huang, Bruce L. Zuraw and Zhixing K. Pan Lipopolysaccharide-driven Th2 Cytokine Production in Macrophages Is Regulated by Both MyD88 and Tram. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(43): 29391–29398
26. Pouliot, Turmel, Gelinac E, Laviolette Bhssonetti, Interleukin-4 production by human alveolar macrophages" *Clin Exp Allergy* 2005; 35 (6):804-10