

Universita v Louisville, Oddělení Patologie
511 South Floyd
Louisville, Kentucky 40202
Václav Větvička, PhD

Experimentální data získaná během předchozích výzkumných projektů nám umožnila s jistotou dospět k závěru, že glukany jsou vysoce aktivní imunostimulátory. Cílem této studie bylo zhodnotit komerční vzorek IMMUGLUCAN <BOO. Použili jsme dvě různé dávky a 14 denní perorální suplementaci. Byla hodnocena jak buněčná tak i humorální imunitní odpověď. Z toho vyplývá, že tento projekt bude schopen odpovědět na otázku, zda vzorek stimuluje jednu nebo dvě větve imunitního systému.

Podmínky:

1. Budou použity myši Balb/c, obě pohlaví, věk 6-8 týdnů
2. Biologická aktivita glukanu bude testována po 14 dnech perorálního krmení (100 nebo 200 ug/myš). Deklarované množství 25% beta glukanu, tj. 25 µg při 100 µg a 50 µg při 200 µg
3. Glukany budou porovnány s negativní kontrolou (PBS).
4. Pro každý experiment bude použito 5 myší.
5. Experiment je určený pro celkem 11 vzorků.

Experimenty:

1. Myšim byly perorálně podávány různé denní dávky vzorků po dobu 14 dnů.
2. Hodnocení fagocytózy v periferní krvi. Po vyhodnocení účinků glukanu na fagocytózu byly použity syntetické mikrokuličky připravené z kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu. Pomocí dobře zavedených technik byly testovány fagocytární aktivity makrofágů izolovaných z peritoneální dutiny a monocytů a neutrofilů v periferní krvi.
3. Hodnocení účinků glukanu na produkci IL-2 splenocyty za použití komerční soupravy IL-2 ELISA. Byla použita kontrolní skupina s Concanvalinem A.
4. Hodnocení účinků glukanu na protilátkovou odpověď. Myši krmené glukaniem (3 týdny v těchto experimentech) byly dvakrát injektovány (den 0 a den 14) ovalbuminem. 21. den byly myši usmrceny, sérum shromážděno a vyhodnoceno na protilátky proti ovalbuminu pomocí ELISA. Jako kontrola byl injikován antigen (ovalbumin) s Freudovými pomocnými látky.
5. Hodnocení povrchových marker CD4, CD8 a CD19 pomocí průtokové cytometrie. Byly testovány buňky izolované ze sleziny.

Výsledky:

Studie fagocytózy (jak u peritoneálních makrofágů, tak u krevních neutrofilů a monocytů) ukázaly, že vzorek má významnou stimulační aktivitu ve všech typech buněk. Byla pozorována malá, ale jasná závislost na dávce (obrázek 1). Podobné výsledky byly nalezeny, když jsme měřili produkci IL-2 (obrázek 2). Produkce IL-2 bez stimulace je obvykle velmi nízká (někdy dokonce 0), takže pozorovaná produkce IL-2 je statisticky významná.

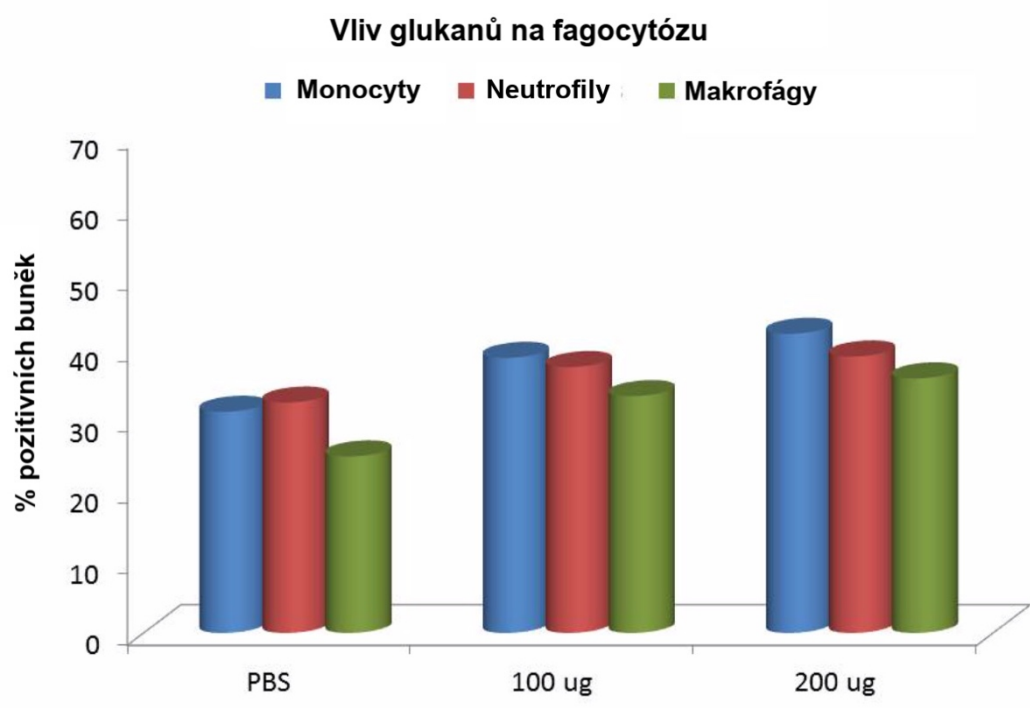
Dále jsme se zaměřili na možnou stimulaci protilátkové odpovědi. Obě dávky významně zlepšily protilátkovou odpověď (ve srovnání pouze s Ag), opět s jasnou závislostí na dávce (obrázek 3). Poslední částí projektu bylo vyhodnocení možných účinků na složení slezinných buněk. CD4-pozitivní a CD-8 pozitivní T lymfocyty a B lymfocyty (CD19 buňky) byly měřeny průtokovou cytometrií. Byla pozorována malá zlepšení počtu B lymfocytů, ale tyto změny nebyly statisticky významné (obrázek 4).

Závěry:

Lze dosáhnout několika závěrů.

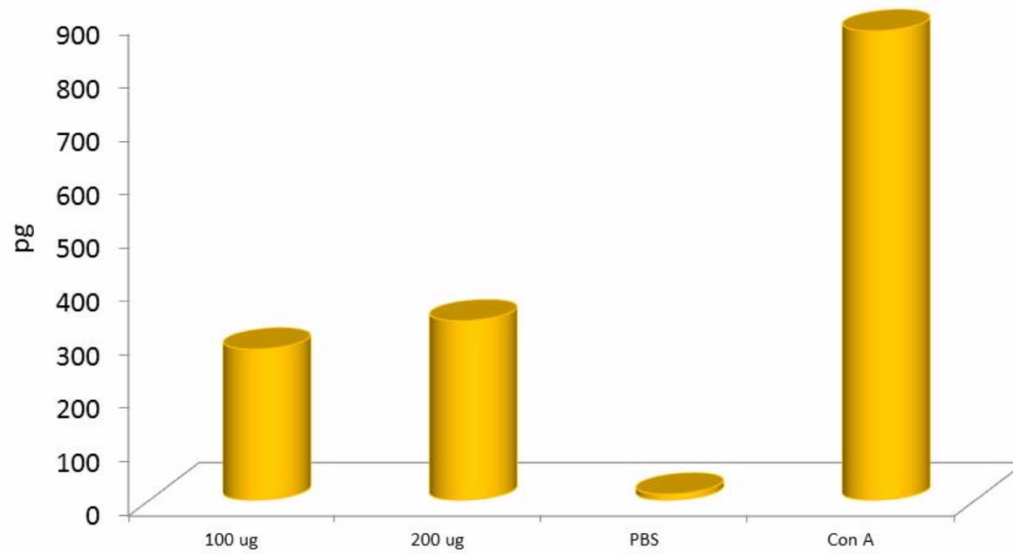
1. Imunostimulační aktivita testovaného vzorku na buněčnou imunitu (fagocytóza) byla potvrzena. Ve srovnání s kontrolním vzorkem došlo ke zvýšení o 30 až 40% bez doplňování.
2. Imunostimulační aktivita testovaného vzorku na humorální imunitu (produkce protilátek a sekrece IL-2) byla potvrzena. Zvýšení 30 - 40krát ve srovnání se standardní reakcí.
3. Bylo potvrzeno zvýšení produkce protilátek o 200 až 300% oproti kontrolnímu Ag.
4. Bylo potvrzeno mírné zvýšení produkce vlastních kmenových buněk o 5-10%, ale vzhledem k krátkému zkušebnímu období je obtížné statisticky vyhodnotit.

Vzhledem k přítomnosti probiotik by mohlo být užitečné dále zhodnotit možné účinky na některé problémy gastrointestinálního traktu.



Obrázek 2

Vliv glukanu na IL-2

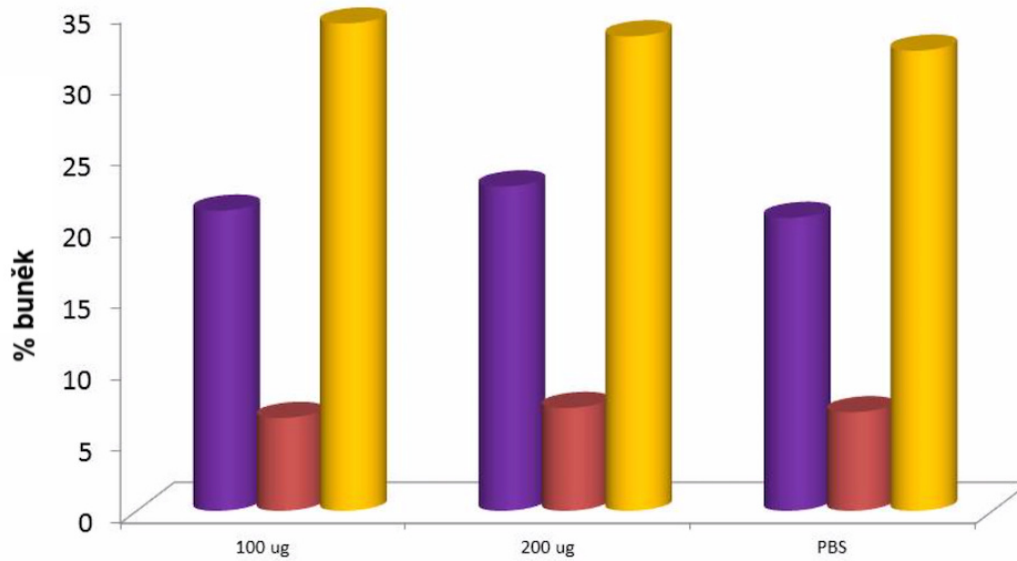


Obrázek 3



Obrázek 4

Účinek glukánů na buňky ve slezině



Z leva do prava: CD4, CD8 a CD19

Department of Pathology
University of Louisville School of Medicine

By:

Name: Vaclav Vetvicka

Title: Researcher

Date: 28 day of October, 2019