

**University of Louisville, Department of Pathology**  
511 South Floyd  
Louisville, Kentucky 40202  
**Vaclav Vetvicka, PhD**

Experimentální údaje získané během předchozích výzkumných projektů publikovaných ve více než 40 výzkumných studiích nám umožnily s jistotou dospět k závěru, že glukany jsou vysoce aktivní imunostimulátory. Cílem této studie bylo vyhodnotit komerční vzorek EPI-PV. Použili jsme dvě různé dávky a 14denní perorální suplementaci. Byla hodnocena buněčná i humorální imunitní odpověď, takže tento projekt bude schopen odpovědět na otázku, zda vzorek stimuluje jednu nebo obě větve imunitního systému.

**Podmínky:**

1. Budou použity myši Balb / c (Jackson), obě pohlaví, věk 6-8 týdnů.
2. Biologická aktivita vzorku bude testována po 14 dnech orálního podávání (100 nebo 200 ug/myš).
3. Testovaný vzorek bude porovnán s negativní kontrolou (PBS).
4. Pro každý experiment bude použito pět myší.

**VZOREK: EPI-PV (Inomed, Česká republika).**

**Experimenty:**

1. Myším byly perorálně podávány různé denní dávky po dobu 14 dnů.
2. Hodnocení fagocytózy v periferní krvi. Za účelem vyhodnocení účinků EPI-PV na fagocytózu byly použity syntetické mikrokuličky připravené z 2-hydroxyethylmethakrylátového kopolymeru. Pomocí zavedených technik byla testována fagocytární aktivita makrofágů izolovaných z peritoneální dutiny a monocytů a neutrofilů v periferní krvi.
3. Hodnocení účinků EPI-PV na produkci IL-2 splenocyty s použitím komerční soupravy IL-2 ELISA. Byla použita kontrolní skupina s Concanavalinem A (Concanavalin A - je rostlinný mitogen známý svou schopností stimulovat myší T-lymfocyty k tvorbě 4 funkčně odlišných populací T-buněk, včetně prekursorů T-supresorů i podmnožiny lidských T-supresorových buněk).
4. Vyhodnocení účinků glukanu na protilátkovou odpověď. Myším krmným glukánem (v těchto experimentech je to 3 týdny) byl dvakrát (den 0 a den 14) injikován ovalbumin. Na 21. den byly myši usmrceny, odebrán sérum a pomocí ELISA hodnocen na protilátky proti ovalbuminu. Jako kontrola byl antigen (ovalbumin) injikován sc. byl použit Freudův adjuvans.
5. Hodnocení povrchových markerů CD4, CD8 a CD19 bylo provedeno průtokovou cytometrií. Byly testovány buňky izolované ze sleziny.

**Výsledek:**

Studie fagocytózy (jak v peritoneálních makrofágech, tak v krevních neutrofilech a monocytech) ukázaly, že vzorek má významnou stimulační aktivitu ve všech třech typech buněk. Byla pozorována malá, ale jasná závislost na dávce (obrázek 1). Podobné výsledky byly nalezeny, když jsme měřili produkci IL-2 (obrázek 2), jediným

rozdílem byla jasněji definovaná závislost na dávce. Produkce IL-2 bez jakékoli stimulace je obvykle velmi nízká (někdy dokonce 0), takže pozorovaná produkce IL-2 je statisticky významná.

Dále jsme zaměřili naši pozornost na možnou stimulaci protilátkové odpovědi. Obě dávky významně zlepšily protilátkovou odpověď (pouze ve srovnání s antigenem), opět s jasnou závislostí na dávce (obrázek 3).

Poslední částí projektu bylo vyhodnocení možných účinků na složení buněk sleziny. CD4-pozitivní a CD-8-pozitivní T-lymfocyty a B-lymfocyty (buňky CD19) byly měřeny průtokovou cytometrií. Byla pozorována malá zlepšení v počtu B-lymfocytů, ale tyto změny nebyly statisticky významné (obrázek 4).

## Závěry:

Podle této studie lze dosáhnout několika závěrů.

Imunostimulační aktivita testovaného vzorku na buněčnou imunitu (fagocytóza) byla potvrzena. Došlo k nárůstu aplikace na 40% ve srovnání s kontrolním vzorkem bez doplňování.

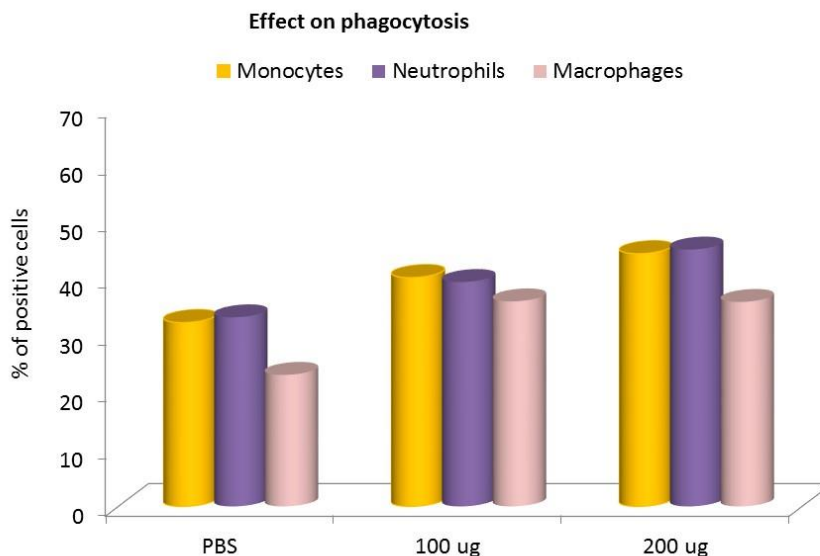
Imunostimulační aktivita testovaného vzorku na humorální imunitu (produkce protilátek a sekrece IL-2) byla potvrzena. Stimulace byla statisticky významná.

Bylo potvrzeno zvýšení produkce protilátek o 260-300% oproti kontrolní Ag.

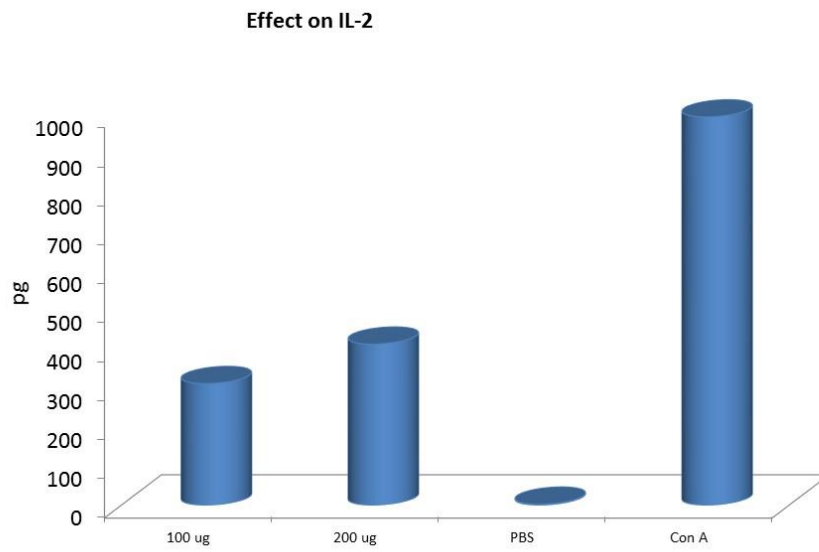
Testovaným materiálem byla směs devíti různých nutraceutik, takže není možné určit, která jednotlivá část je zodpovědná za účinky popsané výše. Z literatury můžeme předpokládat, že většina účinků je pravděpodobně způsobena glukánem, ale pro jistotu by bylo nutné jednotlivé části vyhodnotit samostatně. Tyto experimenty by nejen určily neúčinnější látku, ale také umožnily přípravu optimální směsi.

Aktuální výsledky jasně ukazují, že testovaný materiál podporuje buněčnou i humorální větev imunitních reakcí.

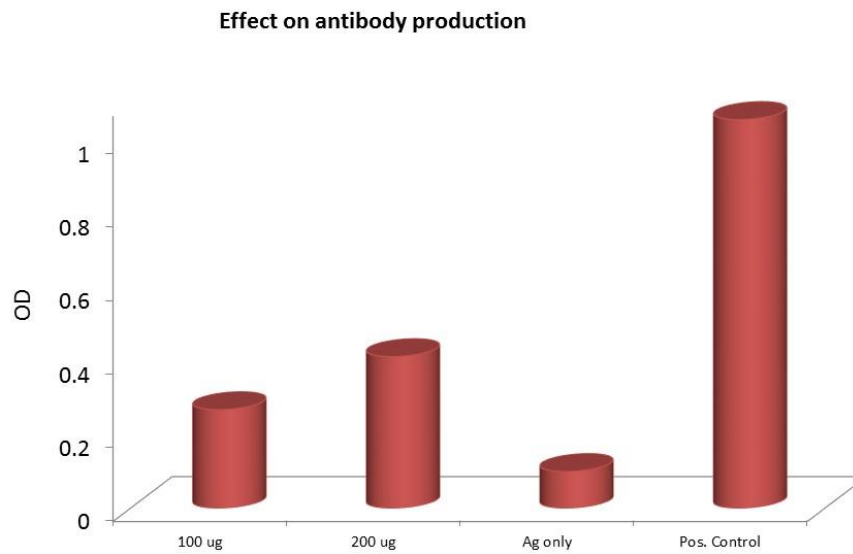
Obrazek 1



Obrazek 2

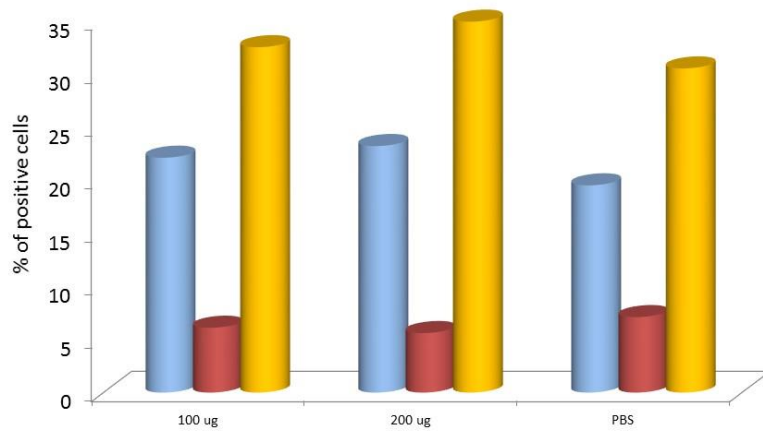


Obrazek 3



Obrazek 4

### Effects on splenocytes



Left to right: CD4, CD8 and CD19

---

Department of Pathology  
University of Louisville School of Medicine

By:

Name: Vaclav Vetvicka

Title: Researcher

Date: 2nd day of April, 2021