

IMUNOMODULATORNA AKTIVNOST KOMBINACIJ ARABINOGALAKTANA IN β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-GLUKANA IN NJUNA INDUKCIJA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF THE COMBINATION OF ARABINOGALACTAN AND β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-GLUCAN IN RELATION TO THEIR'S INDUCTION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY

AVTOR / AUTHOR:

dr. Bratko Filipič¹, prof. biol.,
Lidija Gradišnik², ing. živ. in prehr.
dr. Adriana Pereyra³, univ. dipl. kem.
dr. Domen Jaklič³, univ. dipl. biol.
Jana Potokar³, ing. kem. teh.

¹Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo,
Medicinska fakulteta v Ljubljani,
Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1105 Ljubljana

²Inštitut za biomedicinske vede,
Medicinska fakulteta v Mariboru,
Univerza v Mariboru, Taborska 8, 2000 Maribor

³MEDEX d.o.o., Linhartova 49a, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: Bratko.Filipic@gmail.com

POVZETEK

Imunomodulatorji so snovi, ki pospešujejo ali zavirajo imunski odgovor. Po izvoru so to lahko strukturni deli mikroorganizmov, limfokini, različne snovi rastlinskega izvora in nekatere oblike bakterijske DNA. Med njimi so tudi arabinogalaktani, polimeri iz monosaharidov arabinoze in galaktoze in β -glukani, polisaharidi z glukozo kot strukturno komponento, vezano z β -glikozidno vezjo. Cilj predstavljenih poskusov je bil raziskati imunomodulatorno aktivnost in indukcijo protimikrobne aktivnosti kombinacij 1:15 in 1:20 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in arabinogalaktana iz macesna. Imunomodulacija je bila izvedena v celičnem sistemu: TLT-makrofagi-monociti iz sveže periferne krvi (PBMC) (10^6 celic/ml). Sistem smo obdelali z 10 % kombinacijama 1:15 in 1:20 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in arabinogalaktana za 24 ur pri 37°C in 5 % CO₂ in nato analizirali produkte imunomodulacije in indukcijo protimikrobne aktivnosti. Najprej smo analizirali aktivacijo makrofagov s povečanimi aktivnostmi NO, H₂O₂ in lizocima. Po vezavi na makrofage in interakcije z limfociti, je prišlo do zmanjšanja aktivnosti GM-CSF, povečanja aktivnosti TNF- α in IFN- γ in do znižanja aktivnosti IFN- α ter selektivnega povečevanja aktivnosti IL-1 α , IL-2 in IL-4. Kombinacija 1:15 je bila približno za tretjino bolj aktivna od kombinacije 1:20. Kombinacija 1:15 je bila v *in vitro* pogojih bolj aktivna v indukciji protimikrobne aktivnosti proti po Gramu pozitivnim bakterijam: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* in *Streptococcus mutans* in kvasovki *Candida albicans*, kot tudi proti po Gramu negativnim bakterijam: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* in *Acinetobacter baumannii*.

KLJUČNE BESEDE:

β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan, arabinogalaktan, citokini, imunomodulacija, interferon

ABSTRACT

The immunomodulators are substances capable of interaction with the immune system to up- or down-regulate the specific aspects of host response. They include some structural parts of microorganisms,

some forms of bacterial DNA, lymphokines and plant-derived substances. β -Glucans, polysaccharides containing glucose linked with β -glycosidic bonds and arabinogalactans, biopolymers consisting of arabinose and galactose monosaccharides, are included into this group. The aim of presented experiments was to elucidate the immunomodulatory activity and induction of the antimicrobial activity of the combination of 1:15 and 1:20 of β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and arabinogalactan from larch. The immunomodulation analysis was performed on TLT-macrophage cell line and fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (10^6 cells/ml). After treatment with 10 % of 1:15 and 1:20 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan:arabinogalactan incubated at 37°C for 24 hours, the immunomodulation was analysed. At first, the macrophages were activated by NO "burst", H_2O_2 and lysozyme increase. After binding to the macrophages and induce the interaction with lymphocytes, an increase of GM-CSF, TNF- α and IFN- γ was detected. Concomitantly, the decrease of the proinflammatory cytokines (IFN- α) and the increase of the IL-1 α , IL-2 and IL-4 was found. The combination 1:15 was approximately one third more active than the combination 1:20. The combination 1:15 induces higher antimicrobial activity against Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus mutans* and yeast *Candida albicans* than against Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter baumannii*.

KEYWORDS:

β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan, arabinogalactan, cytokines, immunomodulation, interferon

1 UVOD

Snovi, ki reagirajo z imunskim sistemom in pri tem povečajo ali zavirajo specifične aspekte imunskega odgovora, imenujemo imunomodulatorji (1, 2). Njihova funkcija je ve-

zana na nespecifično stimulacijo makrofagov in s tem imunskega odgovora (3). Po izvoru so to strukturni deli mikroorganizmov, kot so celične stene ali membrane. Imunomodulatorno lahko deluje tudi bakterijska DNA, ki vsebuje nemetilirano zaporedje citozina-gvanina (4). Poleg tega so imunomodulatorji tudi limfokini in različne snovi rastlinskega izvora. Med njimi so tudi arabinogalaktani in β -glukani.

Cilj opravljenih poskusov je bil analizirati imunomodulatorno aktivnost kombinacij β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in arabinogalaktana v celičnem sistemu: TLT-makrofagi – monociti iz sveže periferne krvi (PBMC) (10^6 celic/ml) v zvezi z njihovo indukcijo protimikrobne aktivnosti.

1.1 ARABINOGALAKTANI

Arabinogalaktan je biopolimer sestavljen iz arabinoznih in galaktozskih monosaharidov (5). Macesnov (*Larix* sp.) arabinogalaktan, v nadaljevanju skrajšano **MAG**, je sestavljen iz razvejanih polisaharidov, ki vsebujejo glavno verigo iz galaktana, na katero so kot stranske verige vezane molekule galaktoze in arabinoze. Macesnov arabinogalaktan je pomemben izvor prehranskih vlaknin. Pospešuje nastanek kratkoveržnih maščobnih kislin, in sicer butirata in propionata. Razen tega pa zmanjšuje nastanek in absorpcijo amonijaka. Obstajajo dokazi, da uživanje arabinogalaktana pospešuje delovanje koristne črevesne mikroflore, posebej še črevesnih anaerobov, kot sta *Bifidobacterium* sp. in *Lactobacillus* sp.

MAG ima mnoge zanimive lastnosti, ki so ga postavile za idealno pomožno zdravilno sredstvo uporabno tudi v protokolih zdravljenja raka. Rezultati opravljenih poskusov so pokazali, da arabinogalaktan stimulira citotoksičnost naravnih celic ubijalk (NK), povečuje funkcionalne aspekte imunskega sistema in preprečuje metastaziranje tumorskih celic v jetrih (6). To nakazuje na njegovo klinično uporabo, tako v preventivi, ko "ustvarja" bolj odziven imunski sistem, kot tudi pri zdravljenju zmanjšanih funkcij imunskega sistema, zmanjšani aktivnosti celic NK ali kroničnih virusnih infekcijah.

1.2 B-GLUKANI

β -glukani so verige polisaharidov iz D-glukoze povezane z β -glikozidno vezjo. Najbolj biološko aktivni so β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukani. Eden izmed najpogostejših virov β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukanov je celična stena kvasovke *S. cerevisiae*. Ti so sposobni imunomodulacije in aktivacije imunskega sistema (5).



Netopni β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan je biološko bolj aktiven od vodotopnega β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana (7). Za vezavo β -glukanov sta odgovorna površinski receptor prirojenih imunskih celic imenovan dectin-1 in komplementni receptor 3 (CR3 ali CD11b/CD18). Samo dva receptorja "dovoljujeta" imunskim celicam, da jih spoznajo kot "tuje" (8, 9).

Najbolj se β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukani absorbirajo po peroralnem uživanju na tešče. V zvezi s tem so ugotovili, da enterociti olajšajo prehod β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukanov skozi celično steno tankega črevesa v limfo. Tam se vežejo na makrofage in tako aktivirajo njihove različne imunske funkcije (10). Študije, kjer so uporabili radioaktivno označene molekule so pokazale, da v serumu najdemo manjše in večje fragmente β -glukanov, kar kaže na absorpcijo iz tankega črevesa (11). Celice-M znotraj Peyer-jevih polojev fizično prenašajo netopne glukanske delce v limfoidno tkivo, ki je povezano s črevesom (12).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 MATERIALI

2.1.1 Reagenti in celice

Gojišče po Eagle-u z visoko vsebnostjo glukoze, L-glutamina, 25 mM HEPES-a in antibiotiki (penicilin, streptomycin in gentamicin) dodanimi v koncentraciji 0,1 % standardne količine in raztopina tripsina sta bili pripravljene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratoriju za raziskave interferonov. Uporabili smo fetalni bovini serum (FBS) (Euroclone, Italija). β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan iz *S. cerevisiae*, v nadaljevanju **S β -G** (Immitec nutrition AB, ZDA) in macesnov arabinogalaktan - MAG (Lonza, Švica) in arabinogalaktan iz ameriškega slamnika, skrajšano **EAG** (Pfannenschmidt, Nemčija) je prispevalo podjetje MEDEX d.o.o., Slovenija.

Pri delu smo uporabljali humano makrofagno linijo TLT, ki smo jo dobili od Lidije Gradišnik iz Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru. Mononuklearne celice (PBMC) smo izolirali iz buffy coat-ov pripravljenih iz periferne krvi. Buffy coat-e smo kombinirali in centrifugirali pri 1700 RPM za 20 minut pri 4°C. Sedimentu, ki je vseboval eritrocite, limfocite, makrofage in granulocite smo dodali 9 delov 0,83 % amonijevega klorida. Liza eritrocitov je potekala pri 4°C in je trajala 15-20 minut. Celično suspenzijo smo nato centrifugirali

20 minut pri 2500 obratih in 4°C, supernatant smo odstranili, sediment z levkociti/limfociti/makrofagi pa smo resuspendirali v PBS-u, ki je vseboval 1 % glukoze. Procent preživelih celic smo določali z barvanjem s tripanskim modrilom.

2.1.2 Mikroorganizmi

Vse mikroorganizme, ki smo jih uporabili v poskusih smo dobili iz mikrobne zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Uporabili smo naslednje po Gramu negativne bakterije: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, in po Gramu pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* in *Streptococcus mutans*. Pri delu smo uporabljali tudi kvasovko *Candida albicans*.

2.2 METODE

2.2.1 Obdelava celic

V 10 ml stekleničkah z ravnim dnom, zaprtih z gumijastimi zamaški smo kultivirali humano makrofagno linijo (TLT) z uporabo modificiranega Eaglovega gojišča z dodatkom 10 % FBS. Ko so celice dosegle konfluenco, smo supernatant odstranili in dodali 2 ml suspenzije PBMC (10⁶ celic/ml). Po dveh urah, smo dodali 2,5 ml modificiranega Eaglovega gojišča z dodatkom 2 % FBS. Za indukcijo imunomodulacije in protimikrobne aktivnosti, smo dodali po 0,5 ml 10 % oz. 1 % S β -G, MAG in arabinogalaktana iz ameriškega slamnika – EAG, kot kontrolo. Dodatno pa še: 10 % raztopini S β -G in MAG v medsebojnih razmerjih 1:15 in 1:20. Stekleničke smo inkubirali 24 in 48 ur pri 37°C. Vse poskuse smo izvajali v triplicatu z dvakratno ponovitvijo. Po inkubaciji smo stekleničke centrifugirali 20 minut pri 1700 obratih in 4°C. Supernatante smo filtrirali skozi 0,2 μ m filtre in do analiz hranili na temperaturi -20°C.

2.2.2 Določanje stimulacije makrofagov preko vodikovega peroksida (H₂O₂), lizocima in dušikovega monoksida (NO)

Stimulacijo makrofagov smo določali s pomočjo nastale in sproščene količine H₂O₂ (μ M/ml) v kultiviranih celicah (TLT+PBMC) s pomočjo metode, ki jo je razvil Orsi s sod. (14). K svežim sedimentiranim celicam (TLT+PBMC) smo dodali 500 μ l modificiranega fenol rdečega (50 ml vsebuje: 140 mM NaCl, 10 mM K₂HPO₄, 5,5 mM dekstroze in 8,5 U/ml peroksidaze hrena). Po štirih urah inkubacije na 37°C, smo dodali 100 μ l 1 M NaOH in vse skupaj 10 x razredčili s fiziološko raztopino. Optično gostoto raztopine smo merili

spektrofotometrično pri 620 nm. Kot kontrolo smo uporabili 10 mM H₂O₂.

Količino lizocima v celičnem supernatantu (TLT+PMBC) smo določili po metodi, ki jo je razvil Nash s sod. (15). Pripravili smo različne raztopine vzorca in lizocima. V 1,6 ml MH bujona (pH=6,5) smo dodali 200 µl, 10 mM PBS-a (pH=7,4), 200 µl vzorca celičnega supernatanta, 10³ CFU bakterije *S. pyogenes* in 3 različne koncentracije lizocima: 1, 0, 10 in 100 µg/ml. Po enodnevni inkubaciji pri 37°C smo merili optično gostoto (OD) pri 595 nm. Količino lizocima (µM/ml) smo izračunali v primerjavi z bakterijsko OD po 24 urah.

Koncentracijo stabilnega nitrita, končnega produkta metabolizma NO prisotnega v supernatantu obdelanih ali neobdelanih celičnih suspenzij (TLT+PMBC) smo merili s pomočjo Griessove reakcije (16). K 50 µl supernatanta smo dodali 50 µl Griessovega reagenta (1 % sulfanilamida v 2,5 % H₃PO₄ in 0,1 % naftiletildiamin dihidroklorida v destilirani vodi). Obe raztopini v razmerju 1:1 smo 30 minut mešali pri sobni temperaturi. Absorbanco smo merili pri 550 nm. Standardno krivuljo za nitrit smo pripravili z uporabo 10 – 100 µM natrijevega nitrita v destilirani vodi.

2.2.3 Imunološki testi

Količino inducirane HULFN-αN3 (pg/ml) smo določali s pomočjo Human IFN ELISA kit Platinum ELISA (eBioscience, ZDA). Kot kontrolo smo uporabili mednarodno priznani HULFN-αN3 standard (Human IFN-α Platinum ELISA (BMS 216/BMS 216 TEN, Affymetrix, eBioscience, ZDA). Določanje HULFN-αN3 je potekalo po navodilih proizvajalca.

Količino HULFN-γ (pg/ml) v celičnem (TLT+PMBC) supernatantu so določali s pomočjo Mini ELISA Development Kit (Peprotech, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca. Najprej smo vezali zajemalno (capture) protitelesa (1 µg/ml) na Nunc Maxisorp mikrotiterske plošče, in nato dodali 300 µl blokirajočega (blocking) pufru. **Standarda/Vzorca:** razredčili smo standard (HULFN-γ) od 300 pg do 0,1 pg v dilunetu in dodali 100 µl standarda ali vzorca v vsako luknjico v triplicatu in inkubirali mikrotiterske plošče 6 ur pri 37°C. **Detekcija:** po trikratnem spiranju mikrotiterskih plošč smo razredčili detekcijska protitelesa v dilunetu do koncentracije 1 µg/ml in dodajali po 100 µl/luknjico in mikrotiterske plošče inkubirali pri sobni temperaturi za dve uri. **Avidin-HRP Konjugat:** po spiranju plošč smo raztopili 5,5 µl Avidin-HRP konjugata 1:2000 v 11 ml diluneta in do-

dajali po 100 µl/luknjico. Mikrotiterske plošče smo inkubirali eno uro pri sobni temperaturi. **ABTS Tekoči Substrat:** mikrotiterske plošče smo sprali dvakrat. Na prazne plošče smo nato dodali po 100 µl substrata v vsako luknjico in počakali da se razvije zelena barva. Nato smo dodali v vsako luknjico po 10 µl 1 % SDS in merili optično gostoto pri 650 nm. Reliabilno standardno krivuljo dobimo pri vrednostih, ki ne presegajo 0,2 enote ničelnega koncentracijskega standarda ali 1,2 enoti standarda najvišje koncentracije. Količino GM-CSF (pg/ml) v celičnem supernatantu (TLT+PMBC) smo določali s pomočjo GM-CSF Mini ELISA Development Kit (Peprotech, ZDA) na podoben način kot v primeru HULFN-γ, le da smo tu uporabili GM-CSF specifična zajemalna (capture) in detekcijska protitelesa kot tudi specifični avidin-HRP konjugat.

Poleg tega, smo v celičnem (TLT+PMBC) supernatantu določevali še naslednje citokine: TNF-α, IL-1α, IL-2 in IL-4. Pri vseh smo uporabili specifičen mini ELISA kit (Peprotech, ZDA). Postopki so podobni kot v primeru HULFN-γ, le da smo pri specifičnem markerju uporabili specifična zajemalna (capture) in detekcijska protitelesa, kot tudi specifični avidin-HRP konjugat.

2.2.4 Indukcija protimikrobne aktivnosti

Protimikrobno aktivnost smo določali s pomočjo difuzije v agarju (13). Suspenzijo mikrobov v hranilnem bujonu gostote 0,5 McFarlanda smo »razmazali« po celotni površini Mueller Hinton agarja. S pomočjo kovinskega luknjača smo nato izvrtali 6 mm široke luknje v katere smo dodajali po 70 µl vzorca. Vzorci so bili sledeči: 10 % EAG, 10 % MAG, 10 % Sβ-G, 10 % raztopina Sβ-G in MAG v razmerju 1:15 in 10 % raztopina Sβ-G in MAG v razmerju 1:20. Na kontrolnih ploščah smo dodali po 70 µl 0,1 % raztopine penicilina, streptomocina, gentamicina oziroma 70 µl 0,1 % raztopine antimikotika nistatina. Plošče smo inkubirali 72 ur pri 37°C. Zono inhibicije smo izmerili v mm.

2.2.5 Obdelava podatkov

Vsi poskusi so bili opravljeni v trikratnih ponovitvah. Izrazili smo srednjo vrednost ± standardna deviacija. Za ugotavljanje signifikantnosti smo uporabili t-test.



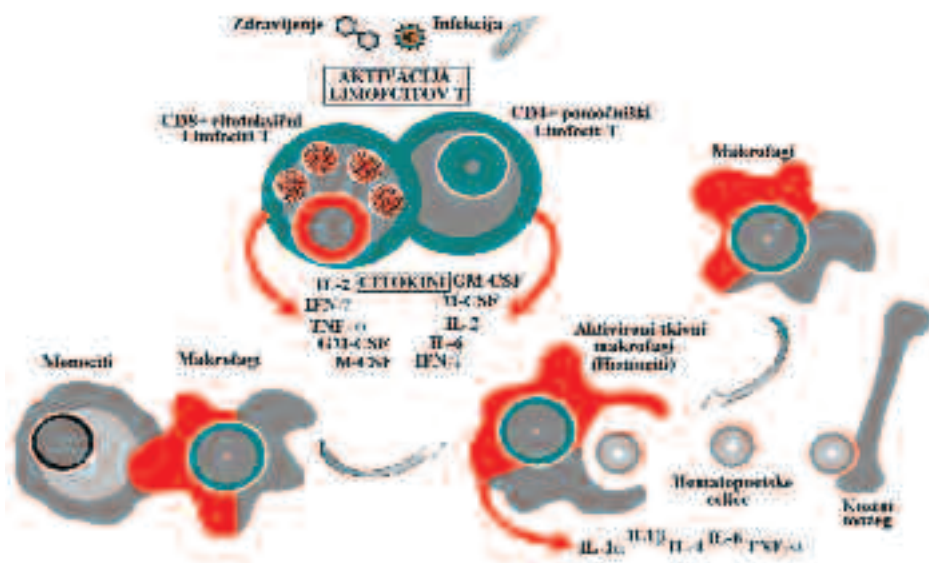
3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Aktivacijo makrofagov *in vivo* lahko povzročita bodisi uporaba zdravil, bodisi je posledica virusne infekcije (Slika 1). *In vitro* jo oponašamo v sistemu: monosloj humane makrofagne celične linije (TLT) na katerem je suspenzija PBMC (10^6 celic/ml) (Slika 2). Podatke o imunomodulatorni aktivnosti β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana, arabinogalaktana, in različnih kombinacijah med njima, lahko razdelimo v dva dela: (a) imunomodulatorna aktivnost in (b) indukcija protimikrobne aktivnosti.

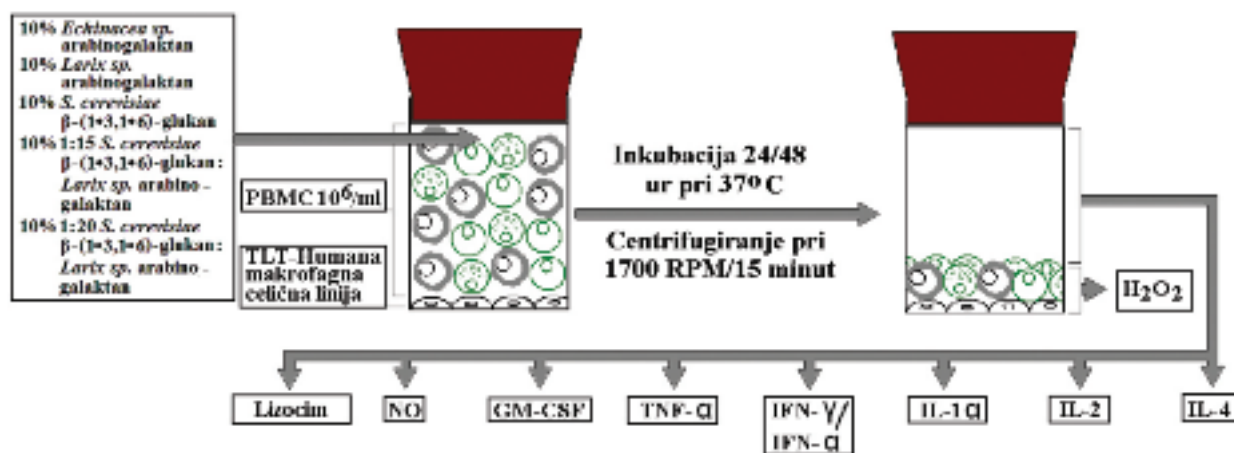
3.1 IMUNOMODULATORNA AKTIVNOST IN VITRO

3.1.1 Vpliv arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in kombinacij med njima na sproščanje H_2O_2 , NO in lizocima.

Vpliv arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in kombinacij med njima na sproščanje H_2O_2 , NO in lizocima je prikazan v Preglednici 1 in Sliki 3.



Slika 1: Aktivacija makrofagov *in vivo*.
Figure 1: Macrophage activation *in vivo*.



Slika 2: Shema aktivacije makrofagov *in vitro* v naših poskuih.
Figure 2: Scheme of the macrophage activation *in vitro* in the performed experiments.

Preglednica 1: Arabinogalaktan in β -(1→3, 1→6)-glukan vplivata na sproščanje H_2O_2 , NO in lizocima.

Table 1: Arabinogalactan and β -(1→3, 1→6)-glucan effect the release of H_2O_2 , NO and lysozim from treated macrophages.

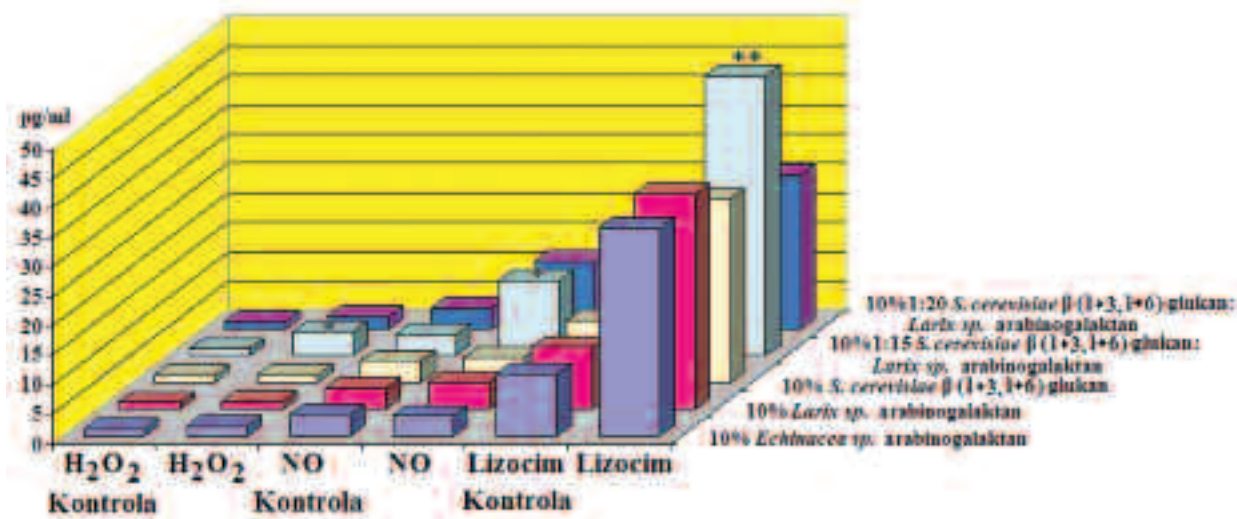
Vzorec:	H_2O_2 μ M/ml		NO (μ M/ml)		Lizocim (μ M/ml)	
	Kontrola celic ¹	H_2O_2 ²	Kontrola celic ¹	NO ²	Kontrola celic ¹	Lizocim ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	1±0,17	1±0,60	3±0,60	3±0,35	10±0,48	35±0,87
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	1±0,17	1±0,20	3±0,60	4±0,60	10±0,48	36±0,50
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1→3, 1→6)-glukan	1±0,17	1±0,18	3±0,60	4±0,12	10±0,48	38±0,18
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1→3, 1→6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	1±0,17	4±0,18*	3±0,60	12±0,74*	10±0,48	47±0,52**
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1→3, 1→6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	1±0,17	2±0,20	3±0,60	11±0,55	10±0,48	26±0,27

Signifikantna razlika: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, ¹ supernatant neobdelanih celic, ² supernatant obdelanih celic

Iz rezultatov je razvidno, da 10 % raztopina β -G in MAG v razmerju 1:15 bolj povečuje sproščanje: H_2O_2 , NO in lizocima iz kombinacije celic TLT + PBMC kot 10 % raztopina v razmerju 1:20.

3.1.2 Vpliv arabinogalaktana, β -(1→3, 1→6)-glukana in kombinacij med njima na sproščanje GM-CSF in TNF- α iz humanih makrofagov.

Rezultati vpliva arabinogalaktana in β -(1→3, 1→6)-glukana, in kombinacij med njima na sproščanje GM-CSF in TNF- α iz humanih makrofagov so prikazani v Preglednici 2 in Sliki 4.



Slika 3: Vpliv arabinogalaktana, β -(1→3, 1→6)-glukana in njihovih kombinacij na nivo sproščenega H_2O_2 , NO in lizocima iz celičnega sistema makrofagna celična linija TLT/PBMC. Signifikantna razlika: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$.

Figure 3: Effect of arabinogalactan and β -(1→3, 1→6)-glucan and their's combination on the level of H_2O_2 , NO and lysozyme released from the cell system: TLT Macrophage cell line/PBMC. Significant difference * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$

Preglednica 2: Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan, in kombinacije med njima vplivajo na sproščanje GM-CSF in TNF- α iz humanih makrofagov.³
 Table 2: Arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and combinations induce the macrophage's release of GM-CSF and TNF- α .³

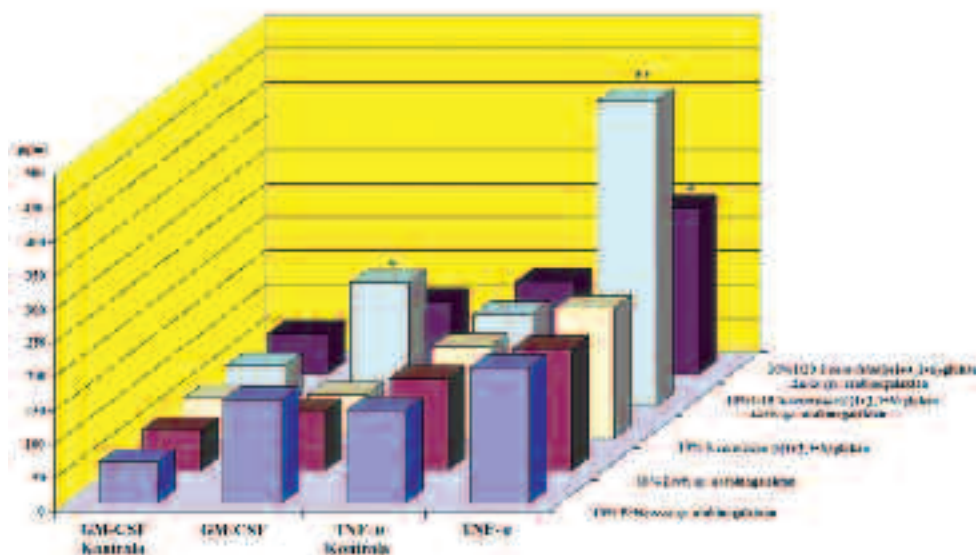
Vzorec	GM-CSF (pg/ml)		TNF- α (pg/ml)	
	Kontrola ¹	GM-CSF ²	Kontrola ¹	TNF- α ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	59±0,89	152±98	136±47	200±29
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59±0,89	87±0,41	136±47	180±35
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	59±0,89	64±0,20	136±47	193±25
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59±0,89	182±63*	136±47	451±76**
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59±0,89	108±45	136±47	247±35*

Signifikantna razlika: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, ¹ supernatant neobdelanih celic, ² supernatant obdelanih celic, ³ v 2 % FBS-u najdemo 29±22 ng GM-CSF in 10 ng/ml TNF- α , ki ne vplivata na rezultate poskusa.

10 % raztopina S β -G in MAG v razmerju 1:15 bolj povečuje nivo GM-CSF in TNF- α v sistemu TLT/PBMC kot 10 % MAG bolj kot njuna 10 % raztopina v razmerju 1:20. 10 % EAG.

3.1.3 Vpliv Arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana, in kombinacij med njima na sproščanje IFN- α in IFN γ in aktivnost citokinov IL1 α , IL-2 ter IL-4.

β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan, arabinogalaktan in kombinacije med njima vplivajo na sproščanje IFN- α , IFN γ (Preglednica 3) (Slika 5). Poleg tega smo pri poskusih opazili tudi vpliv na aktivnost citokinov IL1 α , IL-2 in IL-4, kar je prikazano v Preglednici 4 in grafično na Sliki 6.



Slika 4: Vpliv arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in njihovih kombinacij na nivo sproščenega GM-CSF in TNF- α iz celičnega sistema makrofagna celična linija TLT/PBMC. Signifikantna razlika: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$.

Figure 4: Effect of arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and their's combinations on the level of GM-CSF and TNF- α released from the cell system: TLT Macrophage cell line/PBMC. Significant difference * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$

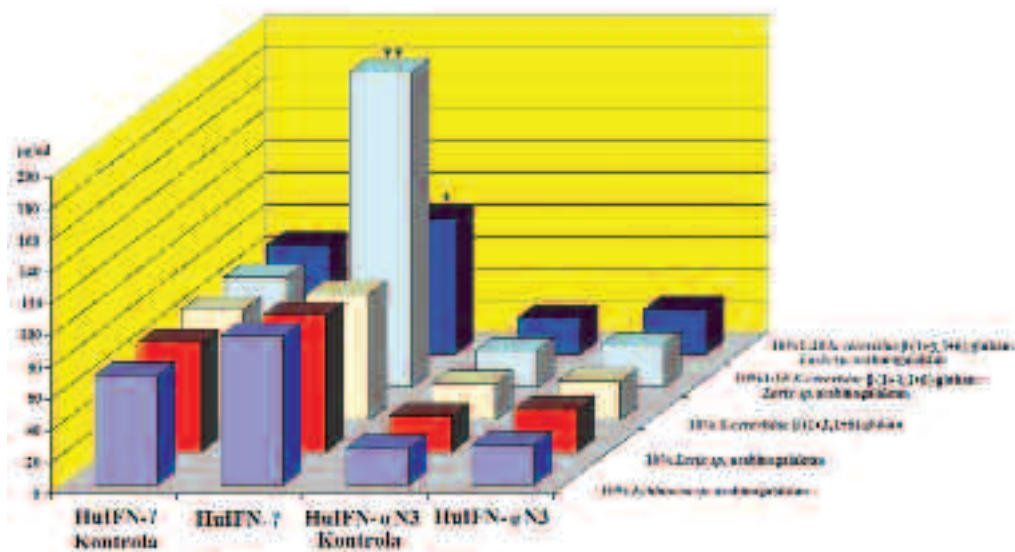
Preglednica 3: Arabinogalaktan in β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan inducirata sproščanje citokinov IFN- α , IFN γ iz humanih makrofagov.³

Table 3: Arabinogalactan and β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and induce the macrophage's release of cytokins: IFN- α , IFN γ .³

Vzorec	HulIFN- γ (pg/ml)		HulIFN- α (pg/ml)	
	Kontrola ¹	IFN- γ ²	Kontrola ¹	IFN- α ²
10% <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	79 \pm 0,69	83 \pm 0,72	22 \pm 0,84	25 \pm 0,55
10% <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	79 \pm 0,69	86 \pm 0,44	22 \pm 0,84	26 \pm 0,54
10% <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	79 \pm 0,69	79 \pm 0,70	22 \pm 0,84	23 \pm 0,23
10% 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	79 \pm 0,69	198 \pm 68**	22 \pm 0,84	28 \pm 0,27
10% 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	79 \pm 0,69	86 \pm 0,88*	22 \pm 0,84	26 \pm 0,24

Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05, ¹ supernatant neobdelanih celic, ² supernatant obdelanih celic, ³ v 2 % FBS-u najdemo: 3.0 \pm 0.9 pg/ml HulIFN- γ in 1.13 \pm 0.09 pg/ml HulIFN- α , ki bistveno ne vplivata na rezultate poskusa.

10 % raztopina S β -G in MAG v razmerju 1:15 bistveno poveča sproščanje HulIFN- γ in zmanjšuje nivo HulIFN- α v supernatantu obdelanih celic (TLT/PMBC).



Slika 5: Vpliv arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in njihovih kombinacij na nivo sproščenega HulIFN- γ in HulIFN- α 3 iz celičnega sistema makrofagna celična linija TLT/PMBC. Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05.

Figure 5: Effect of arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and their's combination on the level of HulIFN- γ nad HulIFN- α 3 released from the cell system: TLT Macrophage cell line/PMBC. Significant difference * p <0,1, ** p <0,05.



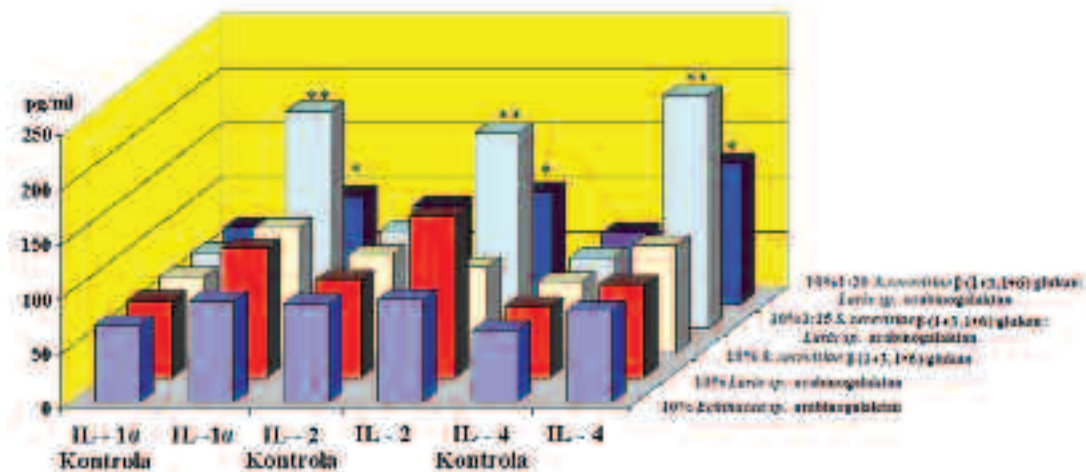
Preglednica 4: Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan in kombinacije med njima vplivajo na aktivnost IL-1 α , IL-2 in IL-4³

Table 4: Arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and combinations induce the macrophage's release of cytokines: IL-1 α , IL-2 and IL-4³

Vzorec	IL-1 α (pg/ml)		IL-2 (pg/ml)		IL-4 (pg/ml)	
	Kontrola ¹	IL-1 α ²	Kontrola ¹	IL-2 ²	Kontrola ¹	IL-4 ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	59 \pm 0,63	91 \pm 0,96	79 \pm 0,33	146 \pm 34	54 \pm 0,99	83 \pm 0,44
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59 \pm 0,63	117 \pm 23	79 \pm 0,33	78 \pm 0,86	54 \pm 0,99	98 \pm 0,56
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	59 \pm 0,63	114 \pm 39	79 \pm 0,33	93 \pm 0,24	54 \pm 0,99	99 \pm 0,89
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59 \pm 0,63	161 \pm 16**	79 \pm 0,33	178 \pm 21**	54 \pm 0,99	212 \pm 36**
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	59 \pm 0,63	98 \pm 14*	79 \pm 0,33	102 \pm 17*	54 \pm 0,99	128 \pm 26*

Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05, ¹ supernatant neobdelanih celic, ² supernatant obdelanih celic, ³ v 2 % FBS-u najdemo: 0.12 \pm 0.09 ng/ml IL-1 α , 22 \pm 0.12 pg/ml IL-2 in 10.0 \pm 0.12 ng/ml IL-4. Tudi te količine v 2 % FBS-u ne vplivajo na rezultate.

10 % S β -G bolj povečuje sproščanje IL-1 α , IL-2 in IL-4 od 10 % EAG in 10 % MAG. 10 % raztopina S β -G in MAG v razmerju 1:15 bistveno bolj povečuje sproščanje IL-1 α , IL-2 in IL-4 kot njuna 10 % raztopina v razmerju 1:20.



Slika 6: Vpliv arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in njihovih kombinacij na nivo sproščenega IL-1 α , IL-2 in IL-4 iz celičnega sistema makrofagna celična linija TLT/PBMC. Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05.

Figure 6: Effect of arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and their combination on the level of IL-1 α , IL-2 and IL-4 released from the cell system: TLT Macrophage cell line/PBMC. Significant difference * p <0,1, ** p <0,05.

3.2 INDUKCIJA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI IN VITRO.

3.2.1 Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam.

Rezultati indukcije protimikrobne aktivnosti arabinogalaktana, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana, in kombinacij med njima so prikazani v Preglednici 5.

3.2.2 Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti po Gramu pozitivnim bakterijam.

Rezultati indukcije protimikrobne aktivnosti proti po Gramu "+" bakterijam z arabinogalaktanom, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukanom in kombinacij med njima so prikazani v Preglednici 6.

3.2.3 Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti kvasovki *Candida albicans*.

Rezultati indukcije protiglivične aktivnosti proti *C. albicans* z arabinogalaktanom, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukanom in kombinacijami med njima so prikazani v Preglednici 7.

Arabinogalaktan stimulira citotoksičnost naravnih celic ubijalk (NK), povečuje funkcionalne aspekte imunskega sistema in preprečuje metastaziranje tumorskih celic v jetra. Tako povečevanje funkcionalnih aspektov imunskega sistema s pomočjo arabinogalaktana, pa nakazuje tudi na njegovo klinično uporabo, tako v preventivi ko "ustvarja" bolj odziven imunski sistem, kot tudi pri zdravljenju zmanjšanih funkcij imunskega sistema, zmanjšani aktivnosti celic NK ali kroničnih virusnih infekcijah (11). V naših poskusih smo uporabili dve vrsti arabinogalaktana in sicer: 10 % EAG in 10 % MAG. V večini primerov se je MAG izkazal za boljše biološko aktivnostjo. Zaradi tega smo ga v poskusih uporabili v kombinaciji s S β -G v razmerjih 1:15 oz. 1:20. Imunomodulatorna aktivnost S β -G je dobro je znana (17). Pri njej pride do aktivacije makrofagov (18), neutrofilcev in celic NK (19), celic T (20) in celic B (21). β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan nespecifično povzroča nastanek rezistence proti bakterijskim (22) in nekaterim virusnim infekcijam (23). Primarno gre pri takih indukcijah protimikrobne aktivnosti za aktivacijo makrofagov tako *in vitro*, kot tudi *in vivo*. Ugotovili so da β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan povzroča aktivacijo makrofagov in s tem selektivno produkcijo različnih citokinov. En način delovanja β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukanov zajema stimulacijo monocitov/makrofagov in sproščanje mediatorjev vključenih v vnetje, kot so: prostaglandin E₂, interferon γ ,

Preglednica 5: Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam¹

Table 5: Arabinogalactan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and theirs combinations induce the antimicrobial rezistence against Gram negative bacteria¹

Vzorec	<i>E. coli</i> ²	<i>P. aeruginosa</i> ²	<i>P. mirabilis</i> ²	<i>A. baumannii</i> ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	3 \pm 0,25	2 \pm 0,15	2 \pm 0,15	4 \pm 0,90
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	10 \pm 2,4*	5 \pm 1,1	4 \pm 0,90	5 \pm 1,1
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	8 \pm 1,9	5 \pm 1,1	6 \pm 1,8	3 \pm 0,25
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	14 \pm 3,7**	10 \pm 2,4**	9 \pm 2,0**	9 \pm 2,0*
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	8 \pm 1,9	7 \pm 1,5*	6 \pm 1,8	6 \pm 1,8
0,1 % penicilin	8 \pm 1,9	4 \pm 0,90	5 \pm 1,1	3 \pm 0,25
0,1 % streptomycin	10 \pm 2,4	7 \pm 1,5	9 \pm 2,0	12 \pm 2,5
0,1 % gentamicin	12 \pm 2,5	8 \pm 1,9	8 \pm 1,9	14 \pm 3,1
70 % povprečja inhibicijske cone (mm \pm) penicilina, streptomicina in gentamicina je služila kot kontrola	7 \pm 0,11	4 \pm 0,41	5 \pm 0,11	6 \pm 0,72

¹ Protimikrobna aktivnost v mm \pm SD, ² Uporabljena koncentracija je bila 0,5 McFarlanda, Signifikantna razlika: *p<0,1, **p<0,05

Preglednica 6: Arabinogalaktan, β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan, in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti po Gramu pozitivnim bakterijam¹.

Table 6: Arabinogalactan and β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan and theirs combinations induce the antimicrobial resistance against Gram positive bacteria¹.

Vzorec	<i>S. aureus</i> ²	MRSA ²	<i>M. luteus</i> ²	<i>S. pyogenes</i> ²	<i>S. agalactiae</i> ²	<i>S. mutans</i> ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	2±0,15	2±0,15	3±0,25	4±0,90	2±0,15	4±0,90
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	4±0,90	4±0,90	9±2,0*	4±0,90	4±0,90	9±2,0
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	4±0,90	7±1,5	6±1,8	10±2,4*	4±0,90	11±2,8*
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	8±1,9*	9±2,0**	11±2,8**	8±1,9	9±1,9*	12±2,5**
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	5±1,1	7±1,5*	8±1,9	6±1,8	5±1,1	8±1,9
0,1 % penicilin	9±2,0	2±0,15	8±1,9	11±2,8	8±1,9	6±1,8
0,1 % streptomycin	6±1,8	8±1,9	12±2,5	14±3,1	14±3,1	11±2,8
0,1 % gentamicin	8±1,9	11±2,8	14±3,1	17±3,7	15±3,3	16±3,7
70 % povprečja inhibicijske cone (mm \pm) penicilina, streptomocina in gentamicina je služila kot kontrola	5±0,32	4±0,9	7±1,2	9±0,8	8±1,61	7±0,7

¹ Protimikrobna aktivnost v mm \pm SD, ² Uporabljen je bila koncentracija po Gramu pozitivnih bakterij 0.5 McFarlanda, Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05

Preglednica 7: β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan, arabinogalaktan, in kombinacije med njima inducirajo protimikrobno aktivnost proti *C. albicans*.²

Table 7: β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan, arabinogalactan, and theirs combinations induce the antimicrobial resistance against yeast *C. albicans*²

Vzorec	<i>Candida albicans</i> ²
10 % <i>Echinacea</i> sp. arabinogalaktan	4±0,9
10 % <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	5±1,1
10 % <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan	7±1,5*
10 % 1:15 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	9±2,0**
10 % 1:20 <i>S. cerevisiae</i> β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukan: <i>Larix</i> sp. arabinogalaktan	6±1,8
0,1 % nistatin	8±1,9
70 % inhibicijske cone nistatina kot kontrola	5±0,6

¹ Protimikrobna aktivnost v mm \pm SD.² Uporabili smo suspenzijo kvasovk koncentracije 0,5 McFarlanda, Signifikantna razlika: * p <0,1, ** p <0,05

interlevkini in faktor tumorske nekroze (TNF-2). Pri taki stimulaciji pride do 1 \rightarrow 3 vezave β -glukanov na receptorje na površini makrofagov. V naših poskusih smo to potrdili, in raziskave razširili na celični sistem: monosloj humanih makrofagov (TLT) in suspenzija PBMC (10⁶ celic/ml) (Slika 2), ki smo ga obdelali z 10 % raztopinama S β -G in MAG v razmerjih 1:15 in 1:20. Ob aktivaciji makrofagov (TLT) najprej pride do »izbruha« NO, povečanja sproščanja H₂O₂ in lizocima. Po interakciji β -glukanov z makrofagi (TLT) in indukciji interakcije s PBMC pride nato do sproščanja GM-CSF, TNF- α in IFN- γ in istočasno do zmanjšanja nivoja vnetnih citokinov (IFN- α). Vzporedno, pa ob taki interakciji pride do selektivnega sproščanja: IL-1 α , IL-2 in IL-4.

4 ZAKLJUČKI

Imunomodulacijo smo izvedli v celičnem sistemu: TLT-makrofagi/monociti iz sveže periferne krvi (PBMC) (10⁶ celic/ml) (Slika 2). Po obdelavi sistema z 10 % raztopino S β -G in MAG v razmerju 1:20 oz. 1:15 za 24 ur pri 37°C smo analizirali produkte imunomodulacije in indukcijo protimikrobne aktivnosti. Najprej je prišlo do vezave kombina-

cije β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glukana in arabinogalaktana na makrofage (TLT – monosloj) in nato do njihove aktivacije, ki je povezana z izbruhom aktivnosti NO ter povečanjem nivoja H₂O₂ in lizocima. Po povzročitvi interakcije z monociti iz periferne krvi (PBMC) je prišlo do povečanja aktivnosti GM-CSF, TNF- α in IFN- γ , in istočasno do znižanja aktivnosti IFN- α ter selektivnega povečevanja aktivnosti IL-1 α , IL-2 in IL-4. Raztopina v S β -G in MAG razmerju 1:15 je bila za tretjino bolj aktivna kot 1:20. Prav tako je ta raztopina, v razmerju 1:15, inducirala večjo protimikrobno aktivnost *in vitro* proti po Gramu “+” bakterijam: *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA), *M. luteus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* in *S. mutans* ter kvasovki *C. albicans*, kot proti po Gramu “-“ bakterijam: *E. coli*, *P.aeruginosa*, *P. mirabilis* in *A. baumannii*. Izgleda, da pri uporabi kombinacije S β -G in MAG v razmerju 1:15 pride do neke vrste sinergije med njima pri povečevanju celokupnega biološkega učinka. Ta kombinacija je pomembna zaradi povečevanja imunskega statusa pri ljudeh in zaradi indukcije protimikrobne rezistence proti po Gramu “+” bakterijam, kvasovki *C. albicans* in nekaterim virusom tudi v *in vivo* pogojih.

5 LITERATURA

1. Stanilova SA, Dobrova ZG, Slavov ES et al. C3 binding glycoprotein from *Cuscuta europea* induced different cytokine profiles from human pbmc compared to other plant and bacterial immunomodulators. *International immunopharmacology* 2005; 5: 723-734.
2. Utoh-Nedos AU, Akah PA, Okoye TC et al. Evaluation of the toxic effects of dihydroartemisinin on the vital organs of wistar albino rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2009; 4: 169-173.
3. Tzianabos AO Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clinical microbiology reviews* 2000; 13: 523-533.
4. Häcker G, Redecke V, and Häcker H Activation of the immune system by bacterial cpG-DNA. *Immunology* 2002; 105(3): 245-251.
5. Ooi VE and Liu F Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry* 2000; 7: 715-729.
6. Teas J The dietary intake of laminaria, a brown seaweed, and breast cancer prevention. *Nutrition and cancer* 1983; 4: 217-222.
7. Miura N Blood clearance of (1 \rightarrow 3)- β -glucan in mrl lpr/lpr mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1996; 13: 51-57.
8. Vetricka V, Dvorak B, Vetrickova J et al. Orally administered marine (1 \rightarrow 3)-beta-d-glucan phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International journal of biological macromolecules* 2007; 40: 291-298.
9. Brown GD and Gordon S Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001; 413: 36-37.
10. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R et al. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: Implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *The Journal of experimental medicine* 1996; 184: 1045-1059.
11. Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G et al. Krestin (psk). *Cancer treatment reviews* 1984; 11: 131-155.
12. Hong F, Yan J, Baran JT et al. Mechanism by which orally administered -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 797-806.
13. Lino A and Deogracious O The in-vitro antibacterial activity of *annona senegalensis*, *securidacca longipendiculata* and *steganotaenia araliacea* - ugandan medicinal plants. *African health sciences* 2006; 6: 31-35.
14. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 2000; 6: 205-219.
15. Nash JA, Ballard TNS, Weaver TE et al. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2006; 177: 519-526.
16. Ding AH, Nathan CF, and Stuehr DJ Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1988; 141: 2407-2412.
17. Estrada A, Yun CH, Van Kessel A et al. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. *Microbiology and immunology* 1997; 41: 991-998.
18. Konopski Z, Seljelid R, and Eskeland T Cytokines and pge2 modulate the phagocytic function of the beta-glucan receptor in macrophages. *Scandinavian journal of immunology* 1993; 37: 587-592.
19. Vetricka V, Thornton BP, and Ross GD Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (cd11b/cd18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of ic3b-opsonized target cells. *The Journal of clinical investigation* 1996; 98: 50-61.
20. Sakurai T, Hashimoto K, Suzuki I et al. Enhancement of murine alveolar macrophage functions by orally administered beta-glucan. *International journal of immunopharmacology* 1992; 14: 821-830.
21. Soltys J, Benková M, and Borosková Z Immunorestorative effect of glucan immunomodulator on guinea pigs with experimental ascariasis. *Veterinary immunology and immunopathology* 1994; 42: 379-388.
22. Reynolds JA, Castello MD, Harrington DG et al. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infection and immunity* 1980; 30: 51-57.
23. Williams DL and Di Luzio NR Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. *Science (New York, N.Y.)* 1980; 208: 67-69.

Slovar:

»Buffy coat« je komponenta krvi, pridobljena s centrifugiranjem enote polne krvi vsebuje pomemben delež levkocitov in trombocitov