

GLUKÁNOVÉ ČASTICE AKO NOSIČE BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK

ZUZANA PLAVCOVÁ, DOMINIK ROTREKL
a JAN HOŠEK

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno
plavcovaz@vfu.cz

Došlo 29.3.18, prijaté 21.6.18.

Kľúčové slová: β -glukán, glukánové častice, očkovanie, nosič

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika
 - 2.1. Popis a príprava glukánových častíc
 - 2.2. Interakcie s receptormi
 - 2.3. Možnosti naviazania látky
3. Využitie
 - 3.1. Vizualizačné metódy
 - 3.2. Očkovacie látky
 - 3.2.1. Glukánové častice a vakcíny
 - 3.2.2. GP použité ako adjuvant a nosič očkovacích látok
 - 3.2.3. GP použité ako nosič pri vakcinácii
 - 3.3. Glukánové častice ako transportné systémy pre nukleové kyseliny
 - 3.4. Glukánové častice ako nosič pre nízkomolekulárne látky
4. Záver

1. Úvod

Transportné systémy v biomedicínskom použití dosiahli významného pokroku počas uplynulých desaťročí. Odbúrateľné polymérne biomateriály sa stávajú vhodnými kandidátmi ako nosiče riadeného/postupného uvoľňovania liečiva. Na poskytovanie účinnej terapie sú vyžadované špecifické fyzikálne, chemické, biologické, biomechanické a degradačné vlastnosti. Medzi výhody prírodných polymérov patrí ich bioaktivita, schopnosť prirodzene prezentovať ligand receptorom, jednoduchá biodegradovateľnosť a nezaťažovanie metabolických a exkrečných systémov. Avšak na druhú stranu, vďaka ich vlastnej bioaktivite, väčšina prírodných polymérov vyvoláva silnú imunitnú odpoveď. Z tohto dôvodu sa skúma široká škála prirod-

ných aj syntetických polymérov schopných degradácie hydrolytickou alebo enzymatickou cestou pre biomedicínske použitie¹.

Princípom enkapsulácie je spraviť ochranný obal okolo aktívnej zložky. Týmto spôsobom sa zvyšuje jej účinnosť, keďže je chránená bariérou pred enzýmami, svetlom, žalúdočnou kyselinou, atď. Vložená látka sa môže nachádzať v rôznych formách ako napríklad v prášku, emulzii alebo filme, a to vo veľkosti mikrometrov alebo nanometrov².

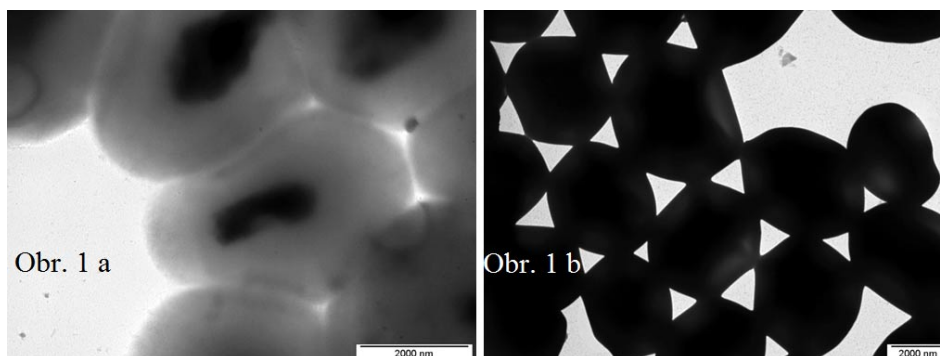
Pre enkapsuláciu sa veľmi často používajú polysacharidy. Sú to kondenzované polyméry, u ktorých sú monosacharidové jednotky spájané pomocou *O*-glykozidickej väzby. Patria medzi najrozsiahlšie skúmané prírodné biomateriály, vďaka ich jedinečnej biologickej aktivite, ako napr. rozpoznanie a aktivácia imunitného systému^{1,3}. Výhodou prírodných polysacharidov je dobrá biokompatibilita, schopnosť biodegradácie, dlhá cirkulácia krvou a netoxické pôsobenie. Po modifikácii našli už dávnejšie využitie ako nosič liečiv napríklad chitosan, oligosacharid cyklodextrín, hyaluronová kyselina, heparín, pektín i glukán⁴.

Táto práca je zameraná na glukánové častice, tvorené prevažne (1-3)- β -D-glukánom s alebo bez (1-6)- β -D-glukózy v postranných reťazcoch, izolované z pivovarských kvasníc *Saccharomyces cerevisiae*, a ktoré boli použité ako nosič enkapsulovaných látok alebo látok naviazaných na povrch týchto častíc. Konkrétne tento druh častíc bol vybraný z dôvodu, že sa posledné roky vynára stále viac publikácií, kde boli častice zo *S. cerevisiae* použité ako prenášač antigénu, liečivých látok alebo ako adjuvant.

2. Charakteristika

2.1. Popis a príprava glukánových častíc

Glukánové častice (GP) (obr. 1a) sú biopolymérne porézne duté útvary oválneho tvaru získavané najčastejšie z pekárenských kvasníc *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 1b) odstránením vnútorných organel a komponentov bunkovej steny, okrem β -D-glukánov. Pripravené duté škrupinky pozostávajú primárne z (1-3)- β -D-glukánu, s alebo bez (1-6)- β -D-glukózy v postranných reťazcoch (>85 %), chitínu/chitozanu (2 %) a sú zbavené proteínov, lipidov (<1 %) a manánu⁵. Soto a Ostroff v roku 2008 uviedli postup, ktorý býva často používaný s malými modifikáciami pri príprave. Ide o rozsuspendovanie a varenie *S. cerevisiae* v 1 M NaOH a zahrievanie na 80 °C 1 h. Prečistený nerozpustný materiál je suspendovaný vo vode a pomocou HCl upravený na pH 4–5 a inkubovaný pri 55 °C. Následne je premývaný niekoľkokrát vodou, izopropano-



Obr. 1. a) Lyofilizované glukánové častice, b) bunky kvasníc pri pozorovaní transmisným elektrónovým mikroskopom (TEM)⁵

lom, a potom acetónom. Kašovitá suspenzia sa suší pri izbovej teplote^{6,7}. Pri porovnaní obr. 1a,b sa dá pozorovať vzniknutá vnútorná dutinka častíc.

2.2. Interakcie s receptormi

Ako sa už spomenulo, GP majú pôvod v *S. cerevisiae* a pozostávajú hlavne z β -1,3-D-glukánov. Všeobecne β -glukány obsahujú vysoko špecifické molekulárne vzorce spojitelné s patogénom (PAMPs)^{8,9}, ktoré sú rozpoznávané hositeľskými glukánovými receptormi sprostredkujúcimi fagocytózu, vrátane Dectin-1 (cit.¹⁰), komplement receptorom 3 (CR3)⁹, proteínom diferenciacnej skupiny (CD) 5 a scavenger receptormi¹¹, ako sú CD36 a SCARF1. Aktivácia komplementu vedie k hubovej opsonizácii a k produkcii chemotaxínov, ktoré prilákajú zápalové bunky¹². Pri aktivácii alternatívnej dráhy komplementu dochádza k ukladaniu obalených C3 konvertázových fragmentov na povrch GP (cit.¹³).

2.3. Možnosti naviazania látky

Na základe elektrostatických alebo hydrofóbných síl môžu byť GP naplnené nano/mikro systémami. Garelo a spol. ukazujú, že malé vo vode rozpustné molekuly môžu byť takisto úspešne a stabilne nanosené do dutiny GP vo forme lipozómov. Tento náklad môže byť účinne a bez poškodenia prepravený k imunokompetentným bunkám k fagocytóze¹⁴. Soto a spol. v roku 2012 publikoval štúdie, v ktorých boli GP použité ako nosič dvoma spôsobmi – buď bola látka vpravená do vnútornej dutinky, alebo pomocou elektrostatických väzieb na povrch chemicky upravených GP. GP boli použité pre prenos látok, ako sú napr. nanočastice cielené na glukánové receptory fagocytujúcich buniek vrodenej imunity, nanočastice s malými molekulami liečiva alebo látok, ktoré sú ťažko pripravované *in situ*, napr. vo vode nerozpustné zlúčeniny^{15,16}.

3. Využitie

Kvôli ich biokompatibilite a veľkosti v rozsahu 2–4 mikrometrov sa GP môžu používať ako materiál prírodného pôvodu v oblastiach, ako sú funkčné potraviny, distribúcia liečiv alebo biomedicínske zobrazovanie^{5,15}. Tieto mikročastice sú taktiež dobrým prírodným nosičom, ktorý môže byť použitý na prenos bioaktívnych látok do tela, ako sú napr. siRNA, DNA a vakcíny. Sú schopné sa premiestniť do rôznych orgánov, ako je pečeň, pľúca a slezina. To im dáva možnosť dodávania terapeutických látok, hlavne tých labilných, do systémového obehu¹⁷.

3.1. Vizualizačné metódy

V štúdiu z roku 2015 boli GP použité ako nosič dvoch amfifilných fluorescenčných farieb – pre *in vivo* experimenty bolo použité farbivo na základe cyanínu a pre mikroskopické *ex vivo* experimenty to bol rhodamín, obe vo forme mikroemulzie. Pomocou blízkeho infračerveného fluorescenčného zobrazovania (NIRF) na myšacom modeli reumatoidnej artritídy bola dokázaná schopnosť GP označiť imunitné bunky *in vivo* a pozorovať ich akumuláciu na mieste zápalu¹⁸. Yunchang Xie a spol. taktiež sledovali glukánové mikročastice cielené na M bunky. Mikročastice boli označené novým druhom blízkeho infračerveného fluorescenčného farbiva v NIRF, išlo o deriváty 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacénu. Počas *in vivo* zobrazovania sa ukázalo, že glukánové mikročastice zotrvali v gastrointestinálnom trakte (GIT) po dobu 12 hodín, následne sa postupne absorbovali z ilea a len málo z jejuna. Histológia potvrdila distribúciu častíc na bazolaterálnu stranu ilea cez Peyerove plaky. Až po 12 hodinách mohli byť detegovateľné aj v pečeni, slezine a pľúcach¹⁹.

3.2. Očkovacie látky

V 20. storočí boli pravé kiahne zodpovedné za viac ako 300 miliónov úmrtí. Ale vďaka celosvetovému očkovaniu sa ich podarilo v roku 1977 eradikovať. Žiaľ, stále nie sú vyvinuté dostatočne účinné očkovacie látky napr.

proti tuberkulóze, vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV) a malárii, ktoré stále spôsobujú mnoho úmrtí²⁰. Preto je zrejmé, že od samého začiatku má očkovanie nepopierateľne veľký vplyv na verejné zdravie. Vakcíny môžu byť inaktivované, kde sú patogény usmrtené, alebo atenuované, ktoré obsahujú živé mikroorganizmy, ale v oslabenej forme. Atenuované očkovacie látky vyvolávajú dlhodobejšiu imunizáciu, ale sú kontraindikované u imunokompromitovaných pacientov, kvôli riziku šírenia infekcií. Inaktivované vakcíny by mali byť bezpečnejšie, ale pre ich nízku alebo žiadnu aktivitu bývajú používané s pomocnými látkami^{20,21}. Vývoj vakcín výrazne pokročil a zameril sa na podjednotky mikroorganizmov, konkrétne na ich antigénne proteíny. Tieto podjednotky sú často menej aktívne, podobne ako inaktivované vakcíny, a preto sú potrebné pomocné látky, ktoré zosilňujú imunitnú odpoveď, ideálne vrodenu aj získanu. Pomocné látky vakcín sú molekuly, zlúčeniny a makromolekulové komplexy pridávané k antigénu na zvýšenie a moduláciu ich imunogenicity. Vložením antigénu do lipozomálnych a polymérnych biomateriálov môžu byť dosiahnuté požadované vlastnosti^{22,23}. Výhodou GP pri vakcinácii je ich možnosť kombinácie ako nosiča pre prenos antigénu i použitia ako adjuvans vďaka ich vlastnej imunomodulačnej aktivite²⁴. Takisto ich výhodou je aj možnosť orálneho podania, ktoré je bezpečnejšie pre zníženie rizika infekcií spojených s aplikáciou pomocou ihiel^{20,21}.

K vyvolaniu dostatočnej imunitnej odpovede buniek prirodzenej imunity musí vakcína obsahovať dostatočný počet molekúl antigénu, ktoré stimulujú tzv. pattern recognition receptors (PRR). Základom imunogenicity hubových antigénov je ich rozpoznanie hlavne pomocou PRR (cit.²⁵).

Perorálne podanie liečiv je najbezpečnejšou a takisto najpohodlnejšou variantou. Avšak niektoré peptidy a proteíny používané pri liečbe, ako je napr. inzulín a kalcitonín, ľahko podliehajú denaturácii a degradácii, a nie sú vhodné pre *per os* podanie. Preto Edith Mathiowitz z Brown University zdôrazňuje, že peptidy potrebujú byť pod ochranou nanočastic, ktoré by udržali ich stabilitu pred enzymatickou degradáciou v GIT (cit.^{26,27}). Táto ochrana je podľa štúdií spôsobená tým, že bunky stavovcov neexprimujú β -1,3-glukanázu, čo znamená, že GP nosiče môžu chrániť uložené látky pred trávením v GIT, ak sú podávané perorálne. Zhang a spol. v práci potvrdili vychytávanie GP peritoneálnymi makrofágmi *in vivo* pokusom na myšiach pri podaní *per os*²⁷.

3.2.1. Glukánové častice a vakcíny

Glukánové mikročastice sú v literatúre popísané ako vhodné nosiče pre orálne podanie, či už liečivých látok¹⁷ alebo antigénov pre vakcíny^{21,28}. Sú schválené americkou Správou potravín a liečiv (FDA) ako potraviny²⁷ a známe pre svoju bezpečnosť, imunogenicitu a vysokú účinnosť enkapsulácie antigénu²⁹. Enkapsulované zlúčeniny v matrix β -glukánu jačmeňa, napr. aj testované probiotiká, sú odolnejšie voči tepelnému ošetrovaniu a gastrointestinálnym podmienkam³⁰. Mikročasticový β -glukán, tvorený primár-

ne z (1-3)- β -D-glukánu, vykazuje vlastnosti aj ako pomocná látka, adjuvant. Jeho spojením s testovaným antigénom vo vakcine vzniká vhodná formulácia, ktorej účinnosť bola potvrdená experimentálnym podaním myšiam pomocou intradermálnej injekcie alebo perorálne³¹.

Posledné roky sa vynára viac a viac štúdií a článkov o zakomponovaní účinnej látky do vnútra GP. Výhodou inkorporácie je hlavne už spomínaná zvýšená stabilita v GIT, čo sa využíva pri testovaní nových očkovacích látok. Všetky ďalej spomínané práce si vybrali pre prípravu glukánových častíc *S. cerevisiae*.

3.2.2. GP použité ako adjuvant a nosič očkovacích látok

GP majú schopnosť viazať sa a stimulovať receptor Dectin-1 vďaka vysokému obsahu (1-3)- β -D-glukánu, čo im umožňuje aktivovať priamo dendritické bunky, ktoré tento receptor exprimujú. Pri pokusoch *in vivo* vyvolávajú predovšetkým odpovede Th1 a Th17 buniek. Pomáhajú modifikovať imunitnú odpoveď k Toll-like receptor (TLR) agonistom, vrátane dendritických buniek a monocytov. Zdôrazňuje to skutočnosť, že hoci súčasná aktivácia viacerých PRR je efektívnou možnosťou pre zosilnenie odpovede, takisto môže spôsobiť úplnú zmenu typu generovanej reakcie²². Zápal je indukovaný prilákanými imunokompetentnými bunkami. Pridanie antigénu cieleného na Dectin-1 vedie k odpovedi CD4+ a CD8+ T buniek aj pri takých dávkach spoločne s GP, u ktorých by samotný antigén nedokázal vyvinúť odpoveď. Poznanie týchto skutočností viedlo k použitiu β -glukánov ako adjuvantov a nosičov¹².

Už v štúdií z roku 2008 Berner a spol. predpokladali, že mikročasticovaný β -glukán zložený z (1-3)- β -D-glukánu a rôzneho počtu (1–6) väzieb, môže poslúžiť ako adjuvant očkovacích látok na zvýšenie špecifickej imunitnej odpovede. Nimi pripravené konjugáty takéhoto mikročasticového β -glukánu s hovädzí sérovým albumínom (BSA) boli aktívne fagocytované myšimi peritoneálnymi makrofágmi. Pri intradermálnej imunizácii tieto zlúčeniny zosilňovali primárnu imunoglobulínovú (Ig) G protilátkovú odpoveď proti BSA, aj keď nespôsobili zvýšenie hodnoty anti-BSA protilátky. Získané výsledky naznačujú, že proteínové antigény môžu byť spojené s glukánovými mikročasticami cez karbodiimidovú väzbu a poskytujú adjuvantný účinok na stimuláciu protilátkovej odpovede na proteínové antigény³¹. Známa duálna aktivita glukánových mikročastíc sa výrazne ukázala aj pri inkorporácii FedF (tipadhezín F18 fimbriae). Tento antigén je jeden z najdôležitejších virulentných faktorov F18⁺ *Escherichia coli*. Tá osídľuje hlavne tenké črevo prasiat, ktorým spôsobuje hnačky i edémové ochorenia. V štúdií boli použité prasacie bunky, nakoľko sú podobnejšie ľudským, než myšacie. Častice boli schopné stimulovať primárny imunitný systém väzbou na α -podjednotku CR3. Dualita bola preukázaná pomocou T-bunkového proliferáčného testu. Naplnené častice vyvolali významnejšie vyššiu FedF-špecifickú T-bunkovú proliferáciu než samotný rozpustný FedF (cit.²⁹).

3.2.3. GP použité ako nosič pri vakcinácii

Svetová zdravotnícka organizácia podporuje vývoj očkovacích látok, ktoré by boli podávané perorálne. Je to hlavne z dôvodu lepšieho prenosu, skladovania a aj podávania v rozvojových krajinách.

Antigén hepatitídy B

Rekombinantný povrchový antigén hepatitídy B (HBsAg), na prevenciu pohlavne prenosnej hepatitídy B, bol enkapsulovaný do glukánových častíc pripravených zo *S. cerevisiae*. Pre perorálnu imunizáciu je dôležité, že častice môžu byť internalizované periférnymi mononukleárnymi bunkami, napr. v myšiacich Peyerových plakoch. Po troch perorálnych imunizáciách výsledky vykazovali zvýšenie sérových hladín anti-HBsAg IgG u 57 % zvierat a anti-HBsAg sekrečného IgA v stolici. Naproti tomu pri podaní prvej dávky subkutánne a následne dvoch dávok perorálne, došlo k zvýšeniu hladín HBsAg špecifických protilátok u všetkých testovaných subjektov⁵².

Antigén Ovalbumín

Ako spomínal Soto a spol., antigén sa môže naviazať nie len do vnútra častice, ale takisto aj na jej povrch^{15,16}. Táto metóda bola využitá pri väzbe ovalbumínu (OVA) na povrch mikročastíc kvasnicových schránok. Antigén, transportovaný pomocou kvasnicovej škrupinky, môže zvyšovať bunkové vychytávanie antigénu dendritickými bunkami (DC), ich zrenie a spúšťanie vylučovania imunitných ko-stimulačných molekúl. Došlo tak k vzniku účinnej generovanej imunitnej odpovede proti nádorovým bunkám *in vivo* s pomocou humorálnej aj bunkovej imunity³³.

Podobná štúdia vyšla aj v roku 2017, kde takisto tento model ukazoval sľubné výsledky pre nádorovú imunoterapiu. V tomto prípade ale OVA ako mikroemulzia bol zavedený do vnútra častíc suspendovaných v cyklohexáne/Igepal CO-520, ktoré boli rozptýlené sonikáciou. Pri *in vivo* aj *in vitro* experimentoch sa zapojili taktiež obe zložky imunitnej odpovede. Výrazne podporili aktiváciu DC a produkciu cytokínov. Tento model sa dá použiť v prípadoch, kde je vyžadovaná silná imunitná odpoveď³⁴.

Takisto aj Huang a spol. pri subkutánnom podaní GP so zapuzdreným OVA antigénom zistili silné odpovede antigén-špecifickej protilátky a T-buniek. Platforma GP vyvolala dlhodobé pamäťové odozvy Th1 a Th17 buniek. Štúdia naznačuje, že to bolo v dôsledku použitia GP ako platformy, ktorá pôsobila ako adjuvant a nosič zároveň³⁵.

Vakína proti *Coccidioides*

Experimentálne bola taktiež skúšaná vakína proti infekcii *Coccidioides*. Myši, ktoré boli intranasálne imunizované vakínou vloženou do glukánovej častice, vykazovali skoršiu pľúcnu infiltráciu aktivovaných Th1, Th2 a Th17 buniek a zvýšenie produkcie CD4⁺ buniek stimulujúcich interferón gamma (IFN γ ⁺) a interleukín (IL)-17 než neočkované myši. Po napadnutí *Coccidioides*, očkované myši vykazovali významné zníženie poškodenia hubovou infekciou a predĺženie prežitia v porovnaní s neočkovanými myšami alebo pri vakcinácii s použitím syntetického

oligodeoxynukleotidového adjuvantu³⁶.

Vakína proti *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gatii*

Glukánové častice sa takisto osvedčili aj pri príprave vakcín proti *C. neoformans* a *C. gatii*. Alkalický extrakt z mutantného kmeňa bez puzdra alebo chitosanu bol vložený do vnútra glukánových častíc. Subkutánnym očkovaním táto látka vytvorila významnú ochranu proti následnej pľúcnej infekcii. Po dvoch týždňoch od tretej vakcinácie boli myši vystavené pôsobeniu vysoko virulentných kmeňov *C. neoformans* a *C. gatii*. V očkovaných a nakazených myších pľúcach bola pozorovaná masívna odpoveď Th1 a Th17 buniek³⁷.

Vakína proti aspergilóze

CD-1 myši boli experimentálne intravenózne nakazené aspergilózou. Profylakticky im boli počas predošlých 3 týždňov podávané celé glukánové častice buď konjugované s BSA, alebo podávané samostatne. Obe tieto metódy predĺžili prežitie a znížili jednotky tvoriace kolónie (CFU) u infikovaných myší. U neinfikovaných očkovaných myší došlo k zvýšenej regulácii kolónie stimulujúcich faktorov, interferónov, faktor nádorovej nekrozy α (TNF- α), chemokínov a Th17-aktivujúcich cytokínov (IL-6, IL-1 β , IL-17). Z toho vyplýva, že bola stimulovaná imunitná odpoveď aj pomocou niektorých prozápalových cytokínov. Došlo k zapojeniu vrodenej aj sekundárnej imunitnej reakcie. V sére nebola detegovaná protilátka anti- β -glukán, čo naznačuje ochrannú odpoveď spôsobenú adaptívnymi T-lymfocytmi a nie B-bunkami. Očkovanie pomocou celých GP alebo celých GP s BSA sa ukázalo ako vhodná ochrana proti aspergilóze. Táto štúdia podporila potenciál GP ako vhodných kandidátov pri očkovaní³⁸.

3.3. Glukánové častice ako transportné systémy pre nukleové kyseliny

Pre reguláciu génovej expzie eukaryotických organizmov je dôležitý proces označovaný ako RNA interferencia (RNAi), kedy je posttranskripcný tlmiaci mechanizmus sprostredkovaný siRNA. RNA indukovaný tlmiaci komplex vzniká inkorporáciou siRNA so špecifickými proteínmi a riadi rozpad, destabilizáciu alebo potlačenie translácie cieľovej mRNA (cit.³⁹). Soto s Ostroffom vo svojej práci z roku 2008 popisujú možnosť prenosu DNA a siRNA, pripravených *in situ* technológiou vrstva po vrstve, pomocou elektrostatických interakcií v glukánových časticiach⁴⁰.

Pri RNA interferenčnej terapii sa zameriavame na ovplyvnenie fagocytujúcich buniek, hlavne makrofágov a dendritických buniek. Často totiž ovplyvňujú choroboplodný zápal a autoimunitné odpovede. Podľa štúdie je toto cielenie na fagocyty spôsobené práve (1-3)- β -D-glukánom⁴¹. S siRNA enkapsulovanou v glukánových časticiach došlo k utlmeniu génovej expzie pri experimentoch s myšiacimi makrofágmi *in vitro* aj *in vivo*. Pri perorálnom podaní častíc s siRNA myši boli ochránené pred lipopoly-

sacharidom (LPS) indukovanou letálnou produkciou TNF- α a IL-1 β vďaka utlmeniu mitogén aktivovanej proteín kináze kináze kináze 4 (MAP4K4) v myších makrofágoch⁴². V nadväznosti na tieto výsledky pokračovali ďalej v zjednodušovaní prípravy častíc na prenos siRNA *in vivo*. Zistili, že pomocou kovalentnej väzby GP s malými aminmi a krátkymi peptidmi, obsahujúcich slabé bázy, umožnili elektrostatické interakcie častíc s siRNA. Následné zníženie elektrostatických interakcií uvoľnilo siRNA, v dôsledku nasýtenia slabých zásad voľnými protónmi pri endozomálnom trávení. Tieto modifikované častice boli účinne internalizované makrofágmi *in vitro*. Na zvieracom modeli takto peptidom upravené GP s siRNA selektívne znižovali expresiu cieľových zápalových cytokínov v makrofágoch⁴³. Oproti iným nosičom je glukánový systém vhodnejší pre celenie M buniek v hornej časti čreva a pre donášku siRNA (cit.⁴⁴).

3.4. Glukánové častice ako nosič pre nízkomolekulárne látky

Z predošlých výskumov je známe, že gárium vo forme gallium tetrafenyl porfyrinových nanočastíc inhibuje HIV infekciu makrofágov⁴⁵. Preto boli skúmané nanočastice gália enkapsulované do vnútra GP pre možnosť inhibície tejto infekcie. Soli gália, ktoré boli v GP, inhibovali postup HIV viac než o 95 % a dosiahli vyššej účinnosti než samotné nanočastice soli gália. Aj v tomto prípade sa glukánové častice ukázali ako prínosný nosič⁴⁶.

Liečivo tyloforin malát NK007 bolo inkorporované do vnútra β -glukán-manánových častíc pri experimentoch s myším modelom akútnej kolitídy vyvolanej dextrán-sulfátom sodným (DSS). Pri *in vitro* experimentoch na RAW 264.7 bunkách došlo k zníženiu expresie prozápalových cytokínov TNF- α detegovaných pomocou imunoenzymatického testu (ELISA). Takto upravené častice boli podané *in vivo* perorálne myšiam, u ktorých došlo k potlačeniu expresie cytokínu TNF- α pomocou makrofágov, ktoré zmiernili prejav akútnej kolitídy vyvolanej DSS (cit.⁴⁷).

Rifampicín, používaný pri tuberkulóze, bol enkapsulovaný pomocou precipitácie do GP, kde bol zabezpečený hydrogélom chitosanu alebo alginátom. Pomocou tohto kompozitu bolo pozorované zníženie rastu *M. tuberculosis* na makrofágoch diferencovaných z kmeňových buniek v porovnaní s kontrolami. Rast *M. tuberculosis* bol vyjadrený v CFU/ml lyzátu buniek makrofágov⁴⁸.

Pre celenú liečbu aterosklerózy boli použité naplnené kvasnicové mikrokapsule rapamycínovými a indometacínovými nanočasticami. Nanočastice boli rýchlo pohlté endocytózou a intracelulárne prenesené endolyzozómovou cestou. V makrofágoch mohli byť uložené až 7 dní. Zvýšený cieleň účinnok na aterosklerózu bol dosiahnutý pomocou zvýšenia transepiteliálnej absorpcie cez M bunky v Peyerových plakoch a následne uľahčenou translokáciou monocytmi/makrofágmi lymfatickým systémom. Po dvoch mesiacoch liečby došlo k pozorovateľnému zmenšeniu plochy plátov. Tieto výsledky demonštrujú využitie GP

ako „Trójskeho kôňa“ pre rôznorodé liečby, či už aterosklerózy alebo iných vaskulárnych ochorení⁴⁹.

Salgado so svojím tímom testovala enkapsuláciu resveratrolu do glukánových častíc proti pôsobeniu huby *Botrytis cinerea*. Resveratrol v kvapalnej forme bol enkapsulovaný do GP. GP zo *S. cerevisiae* dokázali znížiť rast kultúry *B. cinera*, na extrakte Malt agaru o viac ako 50 % oproti použitiu samotného resveratrolu a oproti použitiu glukánových častíc z jačmeňa, bol výrazne efektívnejší^{50,51}.

4. Záver

Výskum v dnešnej dobe napreduje veľmi rýchlo. Stále sa snaží prichádzať s čo najšetrnejšími a prírodnými možnosťami, či už liečiv samotných, ich prenášačov alebo ich spôsobom prípravy. Glukánové častice, ktoré sa začínajú vo vysokej miere využívať ako prírodné polyméry, sa dajú použiť na prenos účinných látok. Tie sú vo vnútri GP chránené pred nepriaznivými podmienkami. Tieto nosiče sú najčastejšie pripravované zo *Saccharomyces cerevisiae*, na ktoré bola aj zameraná táto rešeršná práca.

Ich účinok je modulovaný cez rovnaké receptory ako pri (1-3)- β -D-glukáne, z ktorého sú primárne zložené. Hlavné využitie našli pri príprave nových perorálnych očkovacích látok, kvôli ich možnosti inkorporácie malých, či už hydrofilných alebo lipofilných látok, do vnútornej dutinky alebo na povrch častíc. Je to hlavne z dôvodu ich pôsobenia, kde zastávajú miesto ako nosič a zároveň môžu fungovať aj ako adjuvant, čo je veľkou výhodou. Antigen, pôsobiaci na Dectin-1 receptor, dokáže vyvolať odpoveď vďaka glukánovým časticiam aj pri veľmi nízkych dávkach, keď by samotný antigén bol bez vyvolania adekvátnej odpovede. Viaceré *in vivo* experimenty dokázali aktiváciu dendritických buniek a humorálnej aj bunkovej imunity.

Využitie GP ako nosičov vakcín, zobrazovacích látok, siRNA alebo liečiv nám pomáha objaviť široký potenciál v týchto prírodných polyméroch, pomáhajú vyvolať požadovanú imunitnú odpoveď, bližšie pochopiť mechanizmy pôsobenia a zefektívniť súčasnú liečbu.

Táto práca bola podporovaná grantom AZV Ministerstva zdravotníctva Českej republiky č. 16-27522A.

Skratky

BSA	bovine serum albumin – hovädzí sérový albumín
CD	cluster of differentiation – diferenciačná skupina
CFU	colony-forming unit – jednotky tvoriace kolónie
CR3	complement receptor 3 – komplement receptorom 3
DC	dendritic cells – dendritické bunky
DSS	dextran sulphate sodium – dextrán-sulfát sodný

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay – imunoenzymatický test
FDA	Food and Drug Administration – Správa potravín a liečiv
GIT	gastrointestinálny trakt
GP	glucan particles – β -D-glukánové častice
HBsAg	recombinant hepatitis B surface antigen – rekombinantný povrchový antigén hepatitídy B
HIV	human immunodeficiency virus – vírus ľudskej imunodeficiencie
IFN- γ	interferon gamma – interferón gamma
Ig	imunoglobulín
IL	interleukín
LPS	lipopolysaccharide – lipopolysacharid
Map4k4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 – mitogén aktivovaná proteín kináza kináza kináza 4
NIRF	near infrared fluorescence imaging – blízke infračervené fluorescenčné zobrazovanie
OVA	ovalbumín
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns – špecifické molekulárne vzorce spojiteľné s patogénom
PRR	pattern recognition receptors – vzorec rozpoznávajúce receptory
RNAi	RNA interference – interferencia RNA
siRNA	small interfering RNA – malé interferujúce dvojvlákna RNA
TEM	transmission electron microscopy – transmisný elektrónový mikroskop
TLR	Toll-like receptor – receptor podobný génu Toll
TNF- α	tumor necrosis factor α – faktor nádorovej nekrózy α

LITERATÚRA

- Nair L. S., Laurencin C. T.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 762 (2007).
- Wani T. A., Masoodi F. A., Wani I. A.: *Food Chem.* 234, 119 (2017).
- Xiao R., Grinstaff M. W.: *Prog. Polym. Sci.* 74, 78 (2017).
- Zhang Y., Sun T., Jiang C.: *Acta Pharm. Sin. B* 8, 34 (2017).
- Saloň I., Hanuš J., Ulbrich P., Štěpánek F.: *Food Bioprod. Process.* 99, 128 (2016).
- Soto E. R., Ostroff G. R.: *Bioconjugate Chem.* 19, 840 (2008).
- Chirizzi C., Dastru W., Castelli D. D., Menchise V., Aime S., Terreno E.: *Curr. Mol. Imaging* 4, 29 (2015).
- Bowman S. M., Free S. J.: *BioEssays* 28, 799 (2006).
- Tsoni S. V., Brown G. D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143, 45 (2008).
- Brown G. D., Gordon S.: *Nature* 413, 36 (2001).
- Vera J., Fenutría R., Canadas O., Figueras M., Mota R., Sarrias M.R., Williams D. L., Casals C., Yelamos J., Lozano F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1506 (2009).
- Levitz S. M., Huang H., Ostroff G. R., Specht C. A.: *Semin. Immunopathol.* 37, 199 (2015).
- Agarwal S., Specht C. A., Huang H., Ostroff G. R., Ram S., Rice P. A., Levitz S. M.: *MBio* 2, e00178 (2011).
- Garello F., Stefania R., Aime S., Terreno E., Castelli D. D.: *Mol. Pharmaceutics* 11, 3760 (2014).
- Soto E. R., Caras A. C., Kut L. C., Castle M. K., Ostroff G. R.: *J. Drug Delivery* 2012, 143524 (2012).
- Soto E., Ostroff G., v knihe: *Nanomaterials for Biomedicine* (Nagarajan R., ed.), sv. MCXIX, kap. 3. American Chemical Society, online 2012.
- Xie Y., Jiang S., Xia F., Hu X., He H., Yin Z., Qi J., Lu Y., Wu W.: *J. Mater. Chem. B* 4, 4040 (2016).
- Garello F., Arena F., Cutrin J. C., Esposito G., D'Angeli L., Cesano F., Filippi M., Figueiredo S., Terreno E.: *RSC Adv.* 5, 34078 (2015).
- Xie Y., Hu X., He H., Xia F., Ma Y., Qi J., Dong X., Zhao W., Lu Y., Wu W.: *J. Mater. Chem. B* 4, 2864 (2016).
- Levitz S. M., Golenbock D. T.: *Cell* 148, 1284 (2012).
- De Smet R. a 10 spoluautorov: *J. Controlled Release* 172, 671 (2013).
- Demento S. L., Siefert A. L., Bandyopadhyay A., Sharp F. A., Fahmy T. M.: *Trends Biotechnol.* 29, 294 (2011).
- Moreno-Mendieta S., Guillén D., Hernández-Pando R., Sánchez S., Rodríguez-Sanoja R.: *Carbohydr. Polym.* 165, 103 (2017).
- Huang H., Ostroff G. R., Lee C. K., Specht C. A., Levitz S. M.: *mBio* 1, e00164-10 (2010).
- Iannitti R. G., Carvalho A., Romani L.: *Trends Immunol.* 33, 467 (2012).
- Martz L.: *SciBX* 6, 1 (2013).
- Zhang X., Zhao Y., Xu Y., Pan Y., Chen F., Kumar A., Zou G., Liang X.-J.: *J. Mater. Chem. B* 2, 5882 (2014).
- Baert K., de Geest B. G., de Rycke R., da Fonseca Antunes A., de Greve H., Cox E., Devriendt B.: *J. Controlled Release* 220, 149 (2015).
- Baert K., De Geest B. G., De Greve H., Cox E., Devriendt B.: *Int. J. Nanomed.* 11, 2463 (2016).
- Shah A., Gani A., Ahmad M., Ashwar B. A., Masoodi F. A.: *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 217 (2015).
- Berner V. K., Sura M. E., Hunter K. W. Jr.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1053 (2008).
- Soares E., Jesus S., Borges O.: *Int. J. Pharm.* 535, 261 (2017).
- Pan Y., Li X., Kang T., Meng H., Chen Z., Yang L., Wu Y., Wei Y., Gou M.: *Sci. Rep.* 5, 10687 (2015).
- Yang Z. a 12 spoluautorov: *Biomaterials* 134, 51 (2017).
- Huang H., Ostroff G. R., Lee C. K., Specht C. A., Levitz S. M.: *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1585 (2013).
- Hurtgen B. J., Hung C.-Y., Ostroff G. R., Levitz S. M., Cole G. T.: *Infect. Immun.* 80, 3960 (2012).

37. Specht C. A., Lee C. K., Huang H., Tipper D. J., Shen Z. T., Lodge J. K., Leszyk J., Ostroff G. R., Levitz S. M.: *mBio* 6, e01905-15 (2015).
38. Clemons K. V., Danielson M. E., Michel K. S., Liu M., Ottoson N. C., Leonardo S. M., Martinez M., Chen V., Antonyamy M. A., Stevens D. A.: *J. Med. Microbiol.* 63, 1750 (2014).
39. Ballarín-González B., Dagnaes-Hansen F., Fenton R. A., Gao S., Hein S., Dong M., Kjems J., Howard K. A.: *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 2, e76 (2013).
40. Soto E., Ostroff G.: *Nanotechnology 2008: Life Sciences, Medicine, and Bio Materials (NSTI Nanotech: Technical Proceedings)*, str. 332. CRC, Boston 2008.
41. Tesz G. J. a 15 spoluautorov: *Biochem. J.* 436, 351 (2011).
42. Aouadi M., Tesz G. J., Nicoloso S. M., Wang M., Chouinard M., Soto E., Ostroff G. R., Czech M. P.: *Nature* 458, 1180 (2009).
43. Cohen J. L., Shen Y., Aouadi M., Vangala P., Tencero M., Amano S. U., Nicoloso S. M., Yawe J. C., Czech M. P.: *Mol. Pharmaceutics* 13, 964 (2016).
44. Collnot E.-M., Ali H., Lehr C.-M. J. *Controlled Release* 161, 235 (2012).
45. Narayanasamy P., Switzer B. L., Britigan B. E.: *Sci. Rep.* 5, 8824 (2015).
46. Soto E. R., O'Connell O., Dikengil F., Peters P. J., Clapham P. R., Ostroff G. R.: *J. Drug Delivery* 2016, 8520629 (2016).
47. Chen S., Wang J., Cheng H., Guo W., Yu M., Zhao Q., Wu Z., Zhao L., Yin Z., Hong Z.: *J. Pharm. Sci.* 104, 2276 (2015).
48. Soto E., Kim Y. S., Lee J., Kornfeld H., Ostroff G.: *Polymers* 2, 681 (2010).
49. Zhang X. a 11 spoluautorov: *Mater. Today* 20, 301 (2017).
50. Salgado M., Rodríguez-Rojo S., Alves-Santos F. M., Cocero M. J.: *J. Food Eng.* 165, 13 (2015).
51. Salgado M., Rodríguez-Rojo S., Cocero M. J.: *Carbohydr. Polym.* 174, 1114 (2017).

Z. Plavcová, D. Rotrekl, and J. Hošek (*Department of Molecular Biology and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*): **Glucan Particles as a Carrier of Biological Active Substances**

Nowadays, there is a continuous need to find new types of the safe drugs. This review deals with various possibilities of application of glucan particles (GP), and emphasizes their advantages when used as carrier for oral vaccination. The trend in research is to develop and improve methods of oral vaccination, where the antigen can produce the required immunological responses. Currently, only few vaccines are approved for oral administration. Glucan particles can be used for the stimulation of both humoral and cellular immune response. Substances encapsulated into GP are protected against the harsh environment of the gastrointestinal tract. The particles can be used as a carrier of siRNA and also as a carrier of various kinds of substances like resveratrol.

Keywords: β -glucans, glucan particles, vaccination, carrier