

S.P. Wasser

LEKOVITE PEČURKE U BORBI PROTIV TUMORA I IZVOR IMUNOMODULATORNIH POLISAHARIDA

REZIME-Broj pečurki na Zemlji se procenjuje na oko 140.000. a ipak je poznato samo 10% (otprilike 14.000 poznatih vrsta).Pečurke čine jedan ogroman i potpuno neiskorišćen izvor jakih i novih farmaceutskih proizvoda. One naročito, što je najvažnije za modernu medicinu, predstavljaju jedan neograničeni izvor polisaharida sa antitumorskim i imunostimulatornim karakteristikama.Mnoge, ako ne i sve, Bazidiomicetske pečurke sadrže biološki aktivne polisaharide u plodovima, uzgajanom micelijumu , supi od kuvane kulture. Podaci o polisaharidima pečurki sakupljaju se do sada od 651 vrste i 7 infraspecifičnih taksija 182 roda visokih Hetero- i Homobasidiomiciteta.Ovi polisaharidi su različitog hemijskog sastava i najviše pripadaju grupi β -glukena; oni imaju $\beta(1-)$ lančane spojeve u glavnom lancu glukena i dodatne $\beta-(1-6)$ podpozicije koje su neophodne za njihovo antitumorsko delovanje. Visoko molekularna težina glukena se čini efikasnijom od onih sa nižom molekularnom težinom.Hemijska modifikacija se često vrši radi pojačavanja antitumorskog delovanja polisaharida i njihovih kliničkih kvaliteta (uglavnom rastvorljivost vode). Glavne procedure koje se koriste za hemijsko poboljšanje su : Smith degradacija (oxido-reducto-hidroliza), formoliza, i karboximetilacija. Većina kliničkih podataka o antitumorskoj aktivnosti nam dolazi iz komercijalnog polisaharidskog lentinana, PSK (krestin) i schizophillana, ali polisaharidi nekih drugih lekovitih pečuraka obećavaju puno i takodje pokazuju dobre rezultate. Njihovo dejstvo je takodje blagotvorno na klinikama kada se koriste zajedno sa hemoterapijom. Polisaharidi u pečurkama sprečavaju onkogenezu, imaju direktno antitumorsko dejstvo na razne alogenetske i singenetske tumore, i sprečavaju metastazu tumora. Polisaharidi u pečurkama ne napadaju direktno ćelije raka, već postižu svoj antitumorski efekat delujući na različite imuno činioce kod domaćina. Antitumorsko dejstvo kod polisaharida zahteva jednu netaknutu, čitavu T-ćelijsku komponentu ; njihovo dejstvo se posebno vrši preko timusno-zavisnog imunomehanizma. Praktična primena ne zavisi samo od bioloških karakteristika , već i od biotehnoloških mogućnosti. Ova studija analizira specifičnosti polisaharida dobijenih iz plodova uzgajanog miceliuma (danas dve glavne metode biotehnološke proizvodnje) kod posebno odabranih primeraka lekovitih pečuraka.

UVOD

Hiljadama godina ljudi su smatrali pečurke jestivim i lekovitim resorsom. Kod mnogih vrsta peluraka je identifikovan jedan broj bioaktivnih molekula ,uključujući i antitumorske substance. Polisaharidi su najpoznatije i najpotentije substance dobijene iz pečuraka koje imaju antitumorska i imunomodulatorska svojstva (Mizuno 1996, 1999a,b, 2002; Lorenzen i Anke

1998; Borchers i dr. 1999; Ooi i Liu 1999; Wasser i Weis 1999; Tzianabos 2000; Reshetnikov i dr. 2001). Istorijski, frakcije rastvorljive u vrućoj vodi (kuvanjem dobijeni dekoktati i esencije) Dobijene iz lekovitih pečuraka t.j. uglavnom polisahariti, bile su korišćene kao lek na Dalekom Istoku, odakle potiču sva znanja koja koristimo o pečurkama (Hobbs 1995, 2000). Pečurke kao što su *Galoderma lucidum* (reishi), *Lentinus edodes* (shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) i mnoge druge, sakupljane su i korišćene stotinama godina u Koreji, Kini, Japanu i istočnoj Rusiji. Odatle još uvek vuku osnove modernih naučnih studija o medicinskom dejstvu gljiva, naročito u oblasti stomaka, prostate, i raka pluća. Veoma je značajna i upečatljiva tačnost podataka prikupljenih od strane tradicionalne istočne medicine u studiji o lekovitim pečurkama (Ying i dr. 1987; Hobbs 1995, 2000; Wasser i Weis 1997a,b, 1999; Stamets 2000).

Ikekawa i dr. (1969) su publikovali jednu od prvih naučnih studija o antitumorskim dejstvima substanci dobijenih iz plodova pečuraka koje pripadaju porodici Polyporaceae (Aphyllophoromycetidae) i nekoliko drugim porodicama, što se ogleda kroz posrednu aktivnost domaćina na stečeni rak – kao što je Sarcoma 180 – kod životinja (Ikekawa i dr. 1982, 1992; Ikekawa 2001). Ubtzo zatim napravljena su prva tri glavna leka iz lekovitih pečuraka. Sva tri su bili polisaharidi, pojedinačno β -glukoni: krestin iz micelijalne biomase *Trametes versicolor* (Turkwey Tail), lentinan, iz ploda *L.edodes*, i schizophyllan iz tečnosti uzgajanog ploda *Schizophyllum commune* (Split Gill). Skoro 40 godina lekovite pečurke se proučavaju zbog lekovitih svojstava kod raznih modelarnih sistema, i identifikovano je mnogo novih antitumorskih i imunomodulatornih polisaharida i stavljeno je u upotrebu (Mizuno 1996, 1999a; Wassew i Weis 1999; Ikekawa 2001).

Biološki aktivni polisaharidi su široko zastupljeni kod viših Basidiomycetes pečuraka, i većina njih ima jedinstvenu strukturu kod različitih vrsta. Šta više, različiti rodovi jedne Basidiomycetes vrste mogu da proizvedu polisaharide sa različitim karakteristikama. Na primer, proteoglukan krestin je razvijen u Japanu iz roda *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* CM-101, dok je polisaharid-peptid (PSP) razvijen u Kini iz podroda Cov-1 iste vrste. Oba proteoglukana imaju istu polisaharidnu komponentu, ali sa različitom molekularnom vezom sa polisaharidom (Hiroshu u Takeda 1993).

U ovoj studiji se vrši analiza antitumorskih i imunomodulatorskih polisaharida iz viših Basidiomycetes pečuraka. Veća pažnja se pridaje njihovim opštim karakteristikama nego specifičnim osobenostima . Studija rezimira sveopšta znanja iz oblasti biodiverziteta pečuraka i njihovih polisaharida; hemijsku strukturu polisaharida i njihovu vezu sa antitumorskim dejstvom, uključujući moguće načine hemijske modifikacije; rezultate eksperimentalnog testiranja i kliničke upotrebe antitumorskih ili imunostimulatornih polisaharida; mogućih mehanizama njihovog biološkog dejstva, i konačno razlike u polisaharidskoj frakciji kompozicije plodova i čistoj kulturi odgajenog mycelia kod odabranih primeraka proučavanih lekovitih pečuraka.

VELIKI KVANTITET I RAZNOVRSNOST PEČURAKA SA ANTITUMORSKIM POLISAHARIDIMA

Ukupan broj opisanih gljiva svih vrsta je sigurno barem 80 060 vrsta, a on se bazira na ukupnom broju uz dodatni broj određenih vrsta u svakom rodu, kao što je prikazano u najnovijoj ediciji « REČNIK GLJIVA » (Kirk i dr.) Ovaj broj uključuje sve tradicionalno ispitivane organizme od strane mikologa: sličnih oblika, hromistanske gljive, hitridiaceozne gljive, lišajski-formirane gljive, filamentozne gljive, tipne i kvasne.

Pod pojmom pečurke mi generalno podrazumevamo definiciju Chang i Miles (1992):» makrogljiva sa distinktivnim plodom ,koji može biti ili hipogeozi ili epigeozni, dovoljno velikim da bude uočen golim okom ili ubrano rukom.« Određeni broj filamentoznih gljiva koje spadaju u pečurke po ovoj definiciji se smanjuje po «Rečniku gljiva» za oko 14000 , pa čak i do 22000.(Hawksworth 2001). Medjutim, stvaran broj ovih vrsta na Zemlji je nesumnjivo mnogo veći. Dva glavna razloga što je stvaran broj veći su (1) veliki broj do sada neopisanih vrsta, i (2) činjenica da su mnoge morfološki definisane vrste pečuraka ustvari «mešavina» nekoliko bioloških vrsta (Hawksworth 2001).

Mnoge nove vrste pečuraka su otkrivene u tropskim predelima, naročito one vrste koje formiraju ectomycorrhizine sa prirodnim drvećem. U raznim tropskim predellima 22-55% (u nekim slučajevima i do 73%) vrsti pečuraka nije uopšte opisano i objašnjeno (Hawksworth 2001).Kao što su analize lokaliteta sa kojih dolaze gljive nove za nauku opisane i smeštene u INDEX GLLJIVA tokom 10 godina od 1990 do 1999, pokazale, oko 60% svih novoopisanih gljiva je iz tropskih predela (Hawksworth 1993, 2001), a to je takodje slučaj sa pečurkama, mada nastavljaju da se otkrivaju nove vrste po Evropi i Severnoj Americi.

Studije kompatibilnosti i molekularanih uzročno-posledičnih veza medju pečurkama za koje se ranije smatralo da su iste vrste na morfološkim osnovama, otkrile su «kriptske vrste» t.j. populacije koje funkcionišu kao posebne biološke vrste, ali pod okriljem jednog naučnog imena. Jedinstveno morfološki definisane vrste mogu da se sastoje od 20 ili više bioloških vrsta. (Hawksworth 2001).

Imajući sve ovo u vidu, skorašnje procene broja gljiva na Zemlji variraju od 500 000 do 9,9 miliona vrsta, od kojih samo 80060 imaju imena . Radna brojka od 1.5 miliona vrsta je generalno prihvaćena, a novi podaci sugerišu da to nije bez razloga. Procenjuje se da je broj pečuraka na Zemlji oko 140 000., od kog je samo 10% poznato. U medjuvremenu, od njih, oko 14 000 vrsta koje mi poznajemo danas, za oko 50% se smatra da poseduje razne nivoe jestivosti, više od 2000 njih je bezbedno za jelo, a za oko 700 vrsta se zna da poseduju značajne farmakološke karakteristike (Chang 1999; Wasser i Weis 1999; Reshetnikov i dr. 2001). Stoga, jasno je da pečurke predstavljaju jedan ogroman i još uvek neiskorišćen izvor jakih i novih farmaceutskih proizvoda.

Više Basidiomycetes pečurke predstavljaju jedan bezgraničan izvor antitumorskih ili imunostimulativnih polisaharida. Sve glavne taxonomske grupe pečuraka ispitane su zbog biološki aktivnih polisaharida, a većina njih poseduje takve substance. Najmanje 651 vrsta i 7 infraspecifičnih taksina koje predstavljaju 182 roda Hetero- i Homobasidiomyceteskih

pečuraka sadrže antitumorske ili imunostimulativne polisaharide, kao što se vidi u Tabeli 1 (Reshetnikov i dr.2001). Prirodno sakupljani ili veštački gajeni plodovi, čiste kulture mycelia, i filtrati kulture (tečnost u kojoj se kuvala)- svi sadrže biološki aktivne polisaharide.

Tabela 1. Više Basidiomycetes pečurke koje sadrže antitumorske ili imunostimulativne polisaharide

<u>Taksini (broj ispitanih vrsta)</u>	<u>dejstvo protiv</u>		<u>izvor</u>
	<u>Sarcoma</u>	<u>Ehrich</u>	
	180 solid	solid	
	Rak	rak	
Heterobasidiomycetes			
Auriculariales- Auricularia (3)	70-90	60-80	Ohtsuka i dr.1973 Ukai i dr. 1982; Song i dr.1998
Dacrymycetales-Calocera(1)Dacrymyces(1)	60-90	60	Ohtsuka i dr 1973
Tremellales-Exsidia(1)Guipinia(1)Holtermannia	60-100	70-100	Ohtsuka i dr.1973
Phlogiotis(1)Protodaedalea(1)Pseudohydnum(1)			Gao i dr. 1997
Trumella(2)Tremellodon(1)			
Homobasidiomycetes			
Aphyllorphomycetideae			
Cantharellaceae-Cantharellus(5)Craterellus(2)	60-100	60-90	Ohtsuka i dr. 1973
Clavariaceae-Clavaria(4)Clavariadeiphus(2)Clavulinopsis(4)Lentaria(1)	60-90	60-100	Ohtsuka i dr 1973
Clavulinaceae-Clavulina(1)	70-90	80	Ohtsuka i dr.1973
Sparassidaceae-Sparassis(1)	100	100	Ohtsuka i dr1973 Ohno i dr.2000 Yadoimae i Ohno2000
Ramariaceae-Ramaria(5)	60-80	60-70	Ohtsuka i dr.1973
Hydnaceae-Hydnum(1)	70	90	Ohtsuka i dr.1973 Chung i dr.1982
Hericiaceae-Echinodontium(2)Heridium(2)	70-90	60-80	Ohtsuka i dr.1973
Laxitextum(1)			Mizuno 1999b
Corticaceae-Aleurodiscus(1)Cotylidia(2)Laxitextum(1)Lopharia(1)Merulius(2)			
Phlebia(2)Sarcodon(1)Sisotrema(1)	60-100	60-100	Ohtsuka i dr.1973
Steccherinum(1)Stereum(13)			
Coniophoraceae-Serpula(1)	70	60	Ohtsuka i dr.1973
Thelephoraceae Bankera(1)Calodon(4)	60-100	70-100	Ohtsuka i dr.1973
Hydnellum(2)Polyozellus(1)			Song i dr.1998
Sarcodon(2)Thelephora(1)			Mizuno 2000
Himenochaetaceae-Coltricia(4)Cryptoderma(6)Cyclomyces(1)	60-100	90-100	
Fuscoporia(1)Hymenochaete(4)Hymenostilbe(1)			Kim i dr 1996Han 1999

Inonotus(6)Onnia(1)Phellinus(6)Pyrrhoderma(1)			Mizuno 2000
Fistulinaceae-Fistulina(2)	80	90	Ohtsuka i dr.1973 Ueno i dr. 1978
Ganodermataceae-Ganoderma(7)	70-100	70-100	Ohtsuka 1973Miyazaki I Nishijima1981 Ukai Zang i lin 1999
Polyporaceae-Amauroderma(1)Coriollus(1)Corolus(8)	70-90	70-100	Ohtsuka i dr 1973
Cymatoderma(2)Cystidiophorus(1)Daedalea(1)			Ito i dr.1976
Daedaleopsis(3)Dendropolyporus(1)Favolus(3)Fomes(2)			Ohtsuka i dr 1977
Fomitella(1)Fomitopsis(5)Gloeophyllum(1)Gleoporus(1)			Fujii i dr.1979
Gloeostereum(1)Grifola(2)Hirschioporus(3)Ischnoderma(1)			Liou i Lin1979
Laetiporus(2)Laricifomes(1)Lenzites(1)Meripilus(1)Microporus(2)			Min i dr 1980
Oxyporus(1)Phaeolus(1)Piptoporus(1)Polyporus(10)Poria(1)			Nakajima i dr 1980
Porodisculus(1)Pycnoporus(1)Rigidoporus(2)Trachyderma(1)			Kanaima i dr 1986
Trametes(8)Trichaptum(1)Tyromyces(5)			Mizuno i dr.1992 Gasiorowski i dr1993 Cho1996Nanba1998
Schizophyllaceae-Schizophyllum(1)	70		Fullerton i dr 2000 Ohtsuka i dr 1973 Okamura i dr.1986
Gasteromycetidaeae Gasteromycetales			
Lycoperdaceae-Lycoperdon(2)	-	-	Song i dr.1998
Phallaceae-Dictyophora(1)Kobayasia(1)	-	-	Miyazaki i dr.1975 Ukai i dr. 1983 Hara i dr. 1991 Ishiyama i dr 1996
Bolatales			
Boletaceae-Boletinus(1)Boletus(11)Filoboletus(1)	70-100	90	Ohtsuka i dr.1973
Gyroporus(1)Leccinum(2)Phylloporus(1)Pulveroboletus(3)			
Suillus(5)Tylopilus(3)Xerocomus(3)			
Paxillaceae-Hygrophoropsis(1)Paxillus(3)	60-90	70-80	Ohtsuka i dr.1973
Strobilomyceteceae-Boletellus(2)Porphyrellus(1)	60-80	60-70	Ohtsuka i dr.1973
Strobilomyces(1)			
Gomphidiaceae-Gomphidius(1)Chroogomphus(1)	60-90	60-80	Ohtsuka i dr.1973
Agaricomycetidaeae Agaricales			
Hygrophoraceae-Camarophyllum(2)Hygrocybe(14)	60-100	70-100	Ohtsuka i dr.1973
Hydrophorus(21)Pleurotaceae-Pleurotus(4)	-	-	Yoshioka i dr.1972 Chung i dr.1982 Zhuang i dr. 1994a Song o dr. 1998
Tricholomataceae-Armillarella(3)Asterophora(1)	60-100	60-100	Ohtsuka i dr. 1973

Baeospora(1)Cantharellula(1)Catathelasma(2)Clitocybe(7)			Chung i dr.1982
Collybia(6)Dictyopanus(1)Flammulina(1)Hohenbuehelia(1)			Ikekawa i dr 1982
Hypsizygus(1)Laccaria(6)Lampteromyces(1)Lepista(3)Leucopaxillus(1)			Kim 1982 Ma 1991
Lyophyllum(8)Macrocyttidia(2)Marasmiellus(2)Marasmius(6)Mycena(19)			Ikekawa 1992
Oudemansiella(3)Panellus(1)Pleurocybella(1)Pseudohiatula(2)Resupinatus(1)			Kiho 1992
Triholomopsis(4)Xeromphalina(3)Xerula(2)			Mizuno1994,Liu 1996, Wang1996 Song
Entolomataceae-Clitopilus(2)Entoloma(14)Rhodocybe(1)	60-90	60-100	Ohtsuka i dr.1973
Cortinariaceae-Cortinarius(25)Galerina(6)Gymnopilus(3)	60-100	60-100	Ohtsuka i dr 1973
Hebeloma(3)Inocybe(19)Rozites(1)			
Bolbitiaceae-Agrocybe(7)Bolbitius(2)Conocybe(7)	60-90	70-90	Ohtsuka i dr.1973 Yoshida i dr.1996 Song i dr.1998
Strophariaaceae-Hypholoma(1)Kuehneromyces(1)Naemotaloma(4)	60-100	70-100	Ohtsuka
Pholiota(8)Psilocybe(3)Stropharia(2)			Chung i dr.1982 Song i dr.1998
Crepidotaceae-Crepidotus(3)Tubaria(1)	60-100	90-100	Nakayoshi i dr1968 Ohtsuka i dr 1973
Amanitaceae-Amanita(21)Limacella(1)	60-100	60-90	Ohtsuka i dr.1973 Kiho i dr.1994 Yoshida i dr1996
Pluteaceae-Pluteus(5)Volvariella(1)	60-100	70-100	Ohtsuka i dr1973 Chung i dr.1982 Misaki i dr.1986
Agaricaceae-Agaricus(1)Cystoderma(2)Lepiota(15)	60-100	60-100	Ohtsuka i dr1973
Leucocoprinus(3)Macrolepiota(2)Melanophyllum(1)Phaeolepiota(1)			Mizuno 2002
Coprinaceae-Coprinus(16)Panaeolus(1)Psathyrella(7)Pseudocoprinus(1)	60-100		Ohtsuka1973
Russulales			
Russulaceae-Lactarius(18)Russula(23)	60-100	70-100	Ohtsuka i dr1973

POSTUPCI PURIFIKACIJE POLISAHARINA

Nakon dve dekade intenzivnog istraživanja lekovitih pečuraka, Muzino i njegovi saradnici su u Japanu razvili pouzdane procedure za uspešne ekstrakcije, frakcionalizacije, i purifikacije polisaharida iz plodova ili mycelium kulture. Uopšteno, ova šema obuhvata eliminaciju iz pečuraka substanci niske molekularne težine uz upotrebu 80% etanola, nakon toga uz tri uspešne ekstrakcije vodom (100 C, 3h), 2% amonijum oxalatom (100 C, 6h), i 5% soda hidroxidom (80 C, 6h) (Mizuno 1996, 1999a).

Prva ekstrakcija rezultira u rastvoru vode polisaharidima, druge dve polisaharidima u nerastvorenoj vodi. Ekstrahovani polisaharidi se dalje pročišćavaju kombinacijom više tehnika, kao što su koncentracija etanola, frakcionalna precipitacija, oksidna precipitacija sa acetinskom kiselinom, hromatografija razmene jona, filtracija gela, i hromatografija afiniteta. U osnovi, hromatografija razmene jona kroz DEAE-celulozne kolone odvaja neutralne polisaharide od acidičnih. Neutralni polisaharidi se zatim odvajaju u β -glukone (neabsorbovana frakcija) uz pomoć filtracije gela i hromatografije afiniteta. Ista procedura sa

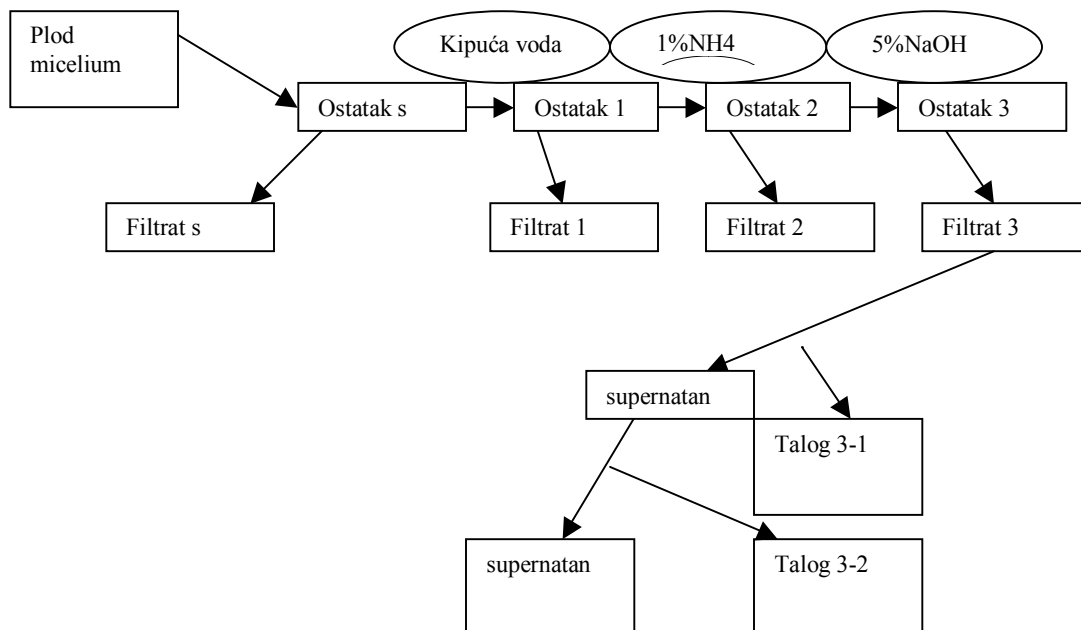
acidičnim polisaharidima(nakon eluzije sa 1 M NaCl) daje pročišćene polisaharide(Mizuno 1999a).

Generalne šeme za frakcionalne pripreme polisaharida iz pečurki su prikazane šematski na sl.1. Treba naglasiti da procedura pojedinačne frakcionizacije zavisi u svakom slučaju od polisaharidnog sastava ekstrahovanog materijala.

STRUKTURALNI SASTAV ANTITUMORNIH POLISAHARIDA KOD PEČURAKA

Polisaharidi pripadaju strukturalno diverzivnoj klasi makromolekula, polimeri monosaharida nalaze se sjedinjeni jedni za druge glukoznim spojevima. Važno je napomenuti da, u poređenju sa drugim biopolimerima kao što su proteini i nukleinske kiseline, polisaharidi nude najveći kapacitet za nošenje bioloških informacija zato što imaju najveći potencijal strukturalne varijabilnosti. Nukleotidi u nukleusnim kiselinama i aminokiseline kod proteina mogu da se međusobno povezuju samo na jedan način, dok monosaharidske celine kod polisaharida mogu da se međusobno povezuju na više mesta kako bi formirale široki varijetet razgranatih ili linearnih struktura. (Sharon i Lis 1993).Ova ogromna potencijalna varijabilnost kod polisaharidnih struktura nudi neophodnu fleksibilnost kod preciznih regulatorskih mehanizama različitih interakcija medju ćelijama kod viših organizama.

Slika 1 -frakcionalna priprema polisaharida iz pečurki(uz modifikaciju adaptirano iz Mizuno(1999a))



Polisaharidi kod pečuraka su uglavnom prisutni kao glukeni sa različitim vrstama glukoznih spojeva, kao što su (1-3), (1-6)- β -glukeni i (1-3)- α -glukeni, dok su neki pravi heteroglikeni. Drugi se uglavnom vezuju za proteinski ostatak kao što PSP postaje kompleksni (PSPC; Gorin i Barreto-Berger 1983). Glavni izvor antitumornog polisaharida su zidovi gljivične ćelije koji se sastoje od polisaharida. Međutim, chitin i chitosan (gljivični chitin) nemaju nikakvo antitumotno dejstvo (Mizuno i dr. 1995b)

B-D-glukan je jedan polisaharid koji se potpuno pokorava D/glukozli pri asidnoj hidrolizi (Mizuno 1996, 1999a). Što se tiče tercijalnog prilagodjavanja strukture schizophyllana, aktivni B-D-glukan ima trostruku desnomotajuću strukturu (Marchessault i dr. 1977). Asidični glucuronoxylomanan izolovan iz ploda TREMELLA fuciformis je takodje bio predstavljen kao «levak» sa konformacijom od trostruke helične kičme (Yui i dr. 1995). Pored dobro poznatih antitumorskih β -(1-3) glukena, opisani su i mnogi ostali biološki aktivni glukeni sa drugačijim strukturama. Ovi polisaharidi imaju linearne ili granske molekule u kičmi koji su sastavljeni od α - i β -povezanih glukoznih junita, i oni sadrže sporedne lance koji su povezani na različite načine. Heteroglukenski sporedni lanci sadrže glukuronsku kiselinu, xilozu, galaktozu, manozu, arabinozu, ili ribozu kao jednu glavnu komponentu ili njihove različite kombinacije.

Glikeni, uopšteno, su polisaharidi koji sadrže i druge junte osim glukoze u njihovoj kičmi. Oni su klasifikovani kao galaktani fucani, xyloza, i manani u odnosu na individualne komponente šećera u kičmi. Heteroglikanski sporedni lanci sadrže arabinozu, manozu, fukozu, galaktozu, xylozu, glukuroničnu kiselinu, i glukozu kao glavnu komponentu ili njihove različite kombinacije.

Ispitivan je širok spektar antitumornih ili imunostimulacionih polisaharida različitih hemijskih struktura iz viših Basidiomycetnih pečurki; glavne vrste se predstavljene u Tabeli 2.

Značajno je visok broj antitumorskih aktivnih frakcija u plodovima pečurki. Jedan primer može se videti kroz analizu polisaharida ploda PLEUROTUS pulmonarius (=P. sajor-caju): 16 polisaharidskih frakcija iz 21 ekstrakcije demonstriraju različite nivoe antitumorskog dejstva (Zhuang i dr. 1993, Tabela 3).

Tab.2 –Hemijska struktura antitumorskih i imunostimulativnih polisaharida viših Basidiomycetesa

Polisaharidi	Vrsta	Referenca
Glukani		
A(1-3)-glukan	Armillariella tabescens	Kiho i dr. 1992a
Linearni α -(1-3)glukan	Amanita muscaria	Kiho i dr. 1994
	Agrocybe aegerita	Yoshida i dr. 1996
A-(1-4)-; β -(1-6)glukan	Agaricus blazei	Fujimiya i dr. 1998b
A-(1-6)-; β -(1-4)glukan	Agaricus blazei	Mizuno i dr. 1990a
B-(1-6)glukan	Lyophyllum decastes	Ukawa i dr. 2000
	Armillariella tabescens	Kiho i dr. 1992a
B-(1-6)-; α -(1-3)glukan	Agaricus blazei	Mizuno i dr. 1990a
B-((1-3)-glucuronoglukan	Ganoderma lucidum	Saito i dr. 1989
Manoksiloglukan	Grifola frondosa	Mizuno i dr. 1986
Galaktoksiloglukan	Hericium erinaceus	Mizuno 1999b
Xyloglukan	Grifola frondosa	Mizuno i dr. 1986

	Polyporus confluens	Mizuno i dr. 1992
	Pleurotus pulmonarius	Zhuang i dr.1993
Xylogalactoglukan	Inonotus obliquus	Mizuno i dr.1999a
Manogalactoglukan	Pleurotus cornucopiae	Gutierrez i dr. 1996
	Pleurotus pulmonarius	Kim i dr.1994
	Ganoderma lucidum	Cho i dr. 1999
	Agaricus blazei	
Galactomanoglukan	Flammulina velutipes	Ikekawa i dr.1982
	Hohenbuehelia serotina	Mizuno i dr.1994
	Leucopaxillus giganteus	Mizuno i dr. 1995a
Arabinoglukan	Ganoderma tsugae	Zhang i dr.1994b.
Riboglukan	Agaricus blazei	Cho i dr.1999
Glikeni		
Arabinogalaktan	Pleurotus citrinopileatus	Zhang i dr.1994a
Glukogalaktan	Ganoderma tsugae	Wang i dr. 1993
Fukogalaktan	Sarcodon aspratus	Mizuno 2000
A-(1-6)Manofukogalaktan	Fomitella fraxinea	Cho i dr.1998
Fukomanogalaktan	Dictyophora indusiata	Hara i dr. 1991
Manogalaktan	Pleurotus pulmonarius	Zhuang i dr. 1993
Manogalaktofukan	Grifola frondosa	Zhuang i dr. 1994a
Xylan	Hericium erinaceus	Mizuno 1999b
Glucoxytan	Hericium erinaceus	Mizuno 1999b
	Pleurotus pulmonarius	Zhuang i dr. 1993
Manoglukoxytan	Hericium erinaceus	Mizuno 1999b
A-(1-3) –manan	Dictyophora indusiata	Ukai i dr. 1983
Glukomanan	Agaricus blazei	Hikichi i dr.1999
B-(1-2)-;B-(1-3)glukomanan	Agaricus blazei	Tsuchida i dr. 2001
		Mizuno i dr.1999b
Galactoglucomanan	Leninus edodes	Fujii i dr.1979

Najaktivnije frakcije sa antitumorskim dejstvom a rastvorljive u vodi od P. Pulmonarius su Fi-a xyloglukan koji sadrži proteine sa Man:Gal:Xyl:Glc u polisaharidu a pri molekularnom odnosu 2:12:42;42, i FA-2 manogalaktan proteinski koji se sastoji od Xyl:Man:Gal (9:35:56 molarni odnos) .Najaktivniji polisaharidi koji nisu rastvorljivi u vodi su FII-1 proteinski xylan;FIII-1a proteinski glukoksilan koji se sastoji od Glc:Xyl(40:44 molarni odnos) i FIII-2a proteinski xyloglukan koji se sastoji od Xyl:Glc (36:62 molarni odnos).

KORELACIJA STRUKTURE I ANTITUMORSKIH DEJSTAVA POLISAHARIDA PEČURAKA

Polisaharidi sa antitumorskim dejstvom se uveliko razlikuju po svojem hemijskom sastavu i konfiguraciji, kao i po svojim fizičkim karakteristikama. Anitumorno dejstvo se ogleda kroz širok spektar glukana koji se protežu od homopolimera do visoko kompleksnih

heteropolimera (Ooi i Liu 1999). Razlike u delovanju mogu se dovesti u vezu sa njihovom rastvorljivošću u vodi, veličinom molekula, stepenom granjanja i oblikom. Mada je teško napraviti korelaciju strukture i antitumornog dejstva kompleksnih polisaharida, određeni odnos se može ustanoviti.

Očigledno je da se strukturalne karakteristike, kao što su β -(1-3) spojevi u glavnom lancu glukana i dodatne β -(1-6) granske tačke, neophodne za antitumorno dejstvo. β -glukani koji uglavnom sadrže (1-6) spojeve imaju manje dejstvo. Glukani veće molekularne težine izgledaju efektivnije od onih sa manjom molekularnom težinom. (Muzino 1996, 1999a).

Medjutim, mogu se takodje primetiti očigledne varijacije kod antitumorskih polisaharida. Antitumorski polisaharidi mogu imati i druge hemijske strukture, kao što su hetero- β -glukani (Mizuno i dr. 1995), heteroglikan (Gao i dr. 1996b), β -glukan-protein (Kawagishi i dr. 1990), α -mano- β glukan (Mizuno i dr. 1995b), α -glukan-protein (Mizuno i dr. 1995b) i heteroglikan-proteinski kompleksi (Zhuang i dr. 1993; Mizuno i dr. 1996).

Tab.3-Struktura antitumorskog dejstva plodova *Pleurotus Pulmonarius* na Sarcoma 180 kod miševa (po Zhung i dr. 1993) FI-FA rastvorljiv u vodi, FII-FIII polisaharidi nerastvorljivi u vodi

Polisaharid	MWx10 ³	protein(%)	total šećer(%)	Komponenta šećera (molarna%)				Odnos inhibicije tumora u 3 Nedelje (%)
				Glc	Xyl	Man	Gal	
FI-a	278	24,1	75,6	43,7	42,3	1,9	11,8	84,8
FI-a- α	420	23,5	69,5	24,1	72,5	2,7	0,7	53,1
FI-a- β	68	26,3	67,0	53,5	27,2	1,6	17,7	49,8
FI-b- α	10	42,1	52,6	56,0	40,7	3,3	-	59,4
Fi-b- β	24	6,9	84,6	-	16,2	-	83,8	31,7
FA-1	11	27,5	67,7	71,6	5,5	-	22,9	48,7
FA-2	115	16,2	76,1	-	9,4	34,6	56,0	74,6
FA-3	10	75,3	22,5	50,0	14,9	13,1	22,0	34,5
FII-1	19	20,5	62,2	5,2	91,2	-	3,6	90,8
FII-2	17	44,1	50,5	9,2	86,2	-	4,6	8,0
FIII-3	13	49,0	50,1	2,9	80,5	-	16,6	8,4
FIII-1a	87	70,5	15,4	39,8	43,7	7,8	8,7	76,9
FIII-1b	24	96,8	3,0	-	97,9	-	2,1	51,6
FIII-2	627	2,8	69,6	33,9	40,3	-	1,9	84,5
FIII-2a	700	2,5	68,8	62,2	35,5	-	2,3	100,0
FIII-2b	190	4,5	74,8	30,9	69,1	-	-	84,6

Trostruko-helijska tercijalna konformacija glukana lekovitih pečuraka β -(1-3) je poznata kao jako važna zbog svog imuno-stimulativnog dejstva. Kada je lentinan bio denaturisan sa dimetil-sulfoksidom, ureom ili sodium hidroksidom, tercijalna struktura je bila izgubljena, dok je primaarna struktura ostala nepromenjena, ali su dejstva inhibicije tumora bila smanjena sa progresivnom denaturacijom (Maeda i dr. 1988). Isti su rezultati dobijeni prilikom ispitivanja schizophyllana, i oni potvrđuju korelaciju između antitumorskog dejstva i trostruke heliksne strukture. (Yanaki i dr. 1983, 1986).

Glukani pečuraka β -(1-3) pokazuju različite biološke i imuno-farmakološke aktivnosti, i mnoge od ovih aktivnosti, kao što su makrophage nitrogen oxid sinteza, i aktivacija limulus faktora G, zavise od trostruko-heliske konformacije, dok su druge nezavisne od ove konformacije, na pr. Sinteza interferon- γ i koloni simulativnog faktora (Yadomae 2000), što indicira da je α -(1-3)-mananska kičmena struktura od veće važnosti nego tercijalna struktura molekula.

Za razliku od β -(1-3) glukana sa lekovitim svojstvima koja jako zavise od visoko molekularne težine, a koja se kreće od 500 do 2,000 kDa (Mizuno 1996), α -(1-3) glukoronoksilomani koji su karakteristični za jelly pečurke, ne zavise jako od molekularne težine. Stoga, Gao i njegovi saradnici (1996) su izvestili da plodovi asidnih frakcija T. Fuciformis sadrže glukoronoksilomane sa molekularnom težinom od 53 do 1 kDa što uključuje ljudske monocite za proizvodnju interleukina-6 isto efikasno kao ne-hidrolizirani heteropolisaharidi. Ovo ukazuje da ovo dejstvo može biti zbog uobičajene strukture α -(1-3)-mananske kičme; razlike u molekularnoj težini nemaju očigledni uticaj na aktivnost heteroglukana (Gao i dr. 1996b).

AKTIVACIJA POLISAHARIDA PEČURAKA HEMIJSKOM MODIFIKACIJOM

U ovoj studiji su opisani različiti pristupi poboljšanja antitumorskog dejstva polisaharida pečuraka. Najuspešnije šeme za hemijsko poboljšanje polisaharida pečuraka je razvijeno za *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* i *Leucopaxillus giganteus* (= *Tricholoma gigantea*). Ove šeme uključuju dve glavne procedure: modifikaciju polisaharida pečuraka Smitovom degradacijom (oksidoreduktivno-hidroliza) i aktivaciju metodom formolize (Mizuno 1996, 1999a). Pet polialdehida i deset polialkohola su bili pripremljeni metodom Smitove degradacije iz frakcija polisaharida prethodno dobijenih iz tečnosti kulture *G. frondosa* miceliuma. Iz ovog razloga, originalne polisaharidske solucije su prvo bile oksidovane polialdehidima 0.1 M NaIO₄ u mraku, a zatim konvertovane u polialkohole redukcijom NaBH₄ u alkalnom medijumu prilagodjenom pH 8 sa 2M NaOH, i hidrolizirane sa 1 M H₂SO₄ na sobnoj temperaturi. (Zhung i dr. 1994b). Hemijska aktivacija polisaharida pečuraka metodom formolize uključuje degradaciju polisaharida formičkom kiselinom u 99% HCOOH soluciji; reakcija solucije je zatim precipitirana sa % EtOH, i pola precipitirana liofiliziranjem nakon dijalize, dok je druga polovina rastvorena u vrućoj vodi, a dodatne frakcije su postignute precipitacijom alkohola (Zhung i dr. 1994b). Pripremljena su četiri formilatirana polisaharida i četiri produkta formolize ovom metodom iz četiri polisaharidske frakcije dobijene iz *G. Frondosa* tečnosti kulture miceliuma. Iako dva od originalnih polisaharida nisu imala dejstvo, njihov polialdehidski poliol, formilativovan, i derivativi formolize pokazali su značajnu aktivnost. Polialdehidi, i poliol-polisaharidi pripremljeni iz polisaharida sa malim antitumorskim dejstvom, pokazali su veće dejstvo nego originalan polisaharid. (Zhuang i dr. 1994b). Pošto sve originalne polisaharidske frakcije koje pokazuju nivo povećane aktivnosti hemijskom modifikacijom su bile β -glukanske ili xiloglukanske, predloženo je da je potrebno promeniti ili eliminisati lanac šećera tokom tretmana, što bi rezultiralo pojačanom rastvorljivošću i aktivnošću (Mizuno 1999a).

Karboximetilacija je drugi hemijski metod korišćen za transformisanje β -glukana u vodorastvorljivoj formi. Na pr., celi plodovi *Pleurotus ostreatus* ili njihovi delovi bili su tretirani sa 0.15 M sodium hidroksidnim rastvorom na 95°C u toku dva sata. Nakupljeni talog je bio ispran vodom, onda suspendovan u rastvoru 0.06% sodium hlorida prilagodjen pH 4,5 acetinskom kiselinom, i mešan šest sati na temperaturi od 50°C. Dobijeni polisaharid je bio β -(1-3) vezani glukan, sa svakim četvrtim glukopiranosilomskim ostatkom substituisanim na 0-6 sa pojedinačnim D-glukopiranosilskim grupama. Heterogena eterifikacija odredjenog glukana sa monohloroacetskom kiselinom (C₂H₃ClO₂) u alkalnom medijumu je dala sodijum so rastvorljivog u vodi glukan derivata O-(karboximetil), (Kuniak i dr. 1993;

Karacsonyi and Kuniak 1994). Karboximetilovani glukan iz *P. Ostreatua* (pleuran) pokazao je imunomodulatorske efekte, naročito povećanu fagocitsku aktivnost (Paulik i dr. 1996).

Na sličan način, vodenom-nerastvorljiv, linearni α -(1-3) glukan dobijen iz plodova *Amanita muscaria* i *Agrocybe aegerita*, imao je vrlo malo ili skoro nikakav antitumorski efekat, dok su njegovi karboximetilizovani produkti pokazali potencijalnu antitumorsku aktivnost (Kito i dr. 1994; Yoshida i dr. 1996).

Hemijska modifikacija granskih polisaharida pečuraka koji rezultiraju sporednom lančanom redukcijom može se dobiti ne samo Smitovom degradacijom već takodje i enzimatskim reakcijama. Novodobijeni linearni polisaharid koji se sastoji od α -(1-4) vezanih α -D glukoznih delova određene molekularne težine od 500-10.000 kDa je bio razvijen nekon uspešnih enzimskih tretmana amulazom, celulazom, i proteazom (Kosuna 1998).

Linearni glukani niske molekularne težine α -(1-4) dobijeni nakon enzimatske redukcije sporednih lanaca i proteinska komponenta (aktivne heksozno korelisane komponente-AHCC) bile su demonstrirane sa svojstvima imunomodulatorskog i anticancerogenog karaktera. (Ghoneum i dr. 1995; Matssushita i dr. 19998). Godine 1992 izveden je u Japanu pokušaj evaluisanja preventivnog efekta AHCC protiv ponovnog javljanja hepatocelularnog carcinoma nakon hiruške resukcije (Kidd 2000).

Sulfarisani homo- i heteropolisaharidi koji poseduju antiviralnu aktivnost su rasprostranjeni u algama, naročito kod morskih algi (Schaeffer i Krylov 2000), ali se prirodno ne pojavljuju kod viših Basidiomycetetskih pečuraka. Hemijski sulfarisane schizophyllani sa različitom količinom sulfura su dobijeni iz β -(1-3)-glukana iz *Schizophyllum commune* (Itoh i dr. 1990; Hirata i dr. 1994). Preporučeno je da je sadržaj sulfura kod schizophyllana važniji kod inhibitiranog porasta ljudskog imunodbrambenog virusa (HIV) od molekularne težine ili prirode šećerne komponente (Itoh i dr. 1990; Hobbs 1995). Testovi lekovitosti pokazuju da sulfarisani schizophyllan sa šećernom komponentom od 5% može biti koristan kao jedan anti-HIV agent u lečenju HIV-om inficiranih hemofiličara (Hirata i dr. 1994; Hobbs 1995).

Važno je shvatiti da je hemijska modifikacija neophodna u mnogim slučajevima radi poboljšanja ne samo antitumorske aktivnosti polisaharida pečurki, već takodje i njihovih kliničkih kvaliteta, od kojih je najvažnija rastvorljivost u vodi i mogućnost prožimanja stomačnih zidova nakon oralne upotrebe.

TESTIRANJE ANTITUMORSKE I IMUNOMODULATORNE AKTIVNOSTI POLISAHARIDA PEČURKI

Inicijalni podaci antitumorskog dejstva ekstrakata pečurki je bila slučajna i ni na koji način čvrsta i pouzdana. Medjutim, mnogi indirektni podaci koji su pažljivo sakupljeni i obradivani, pružili su čvrste dokaze dobrotvornih efekata pečurki na ljudsko zdravlje. Dobar primer se nalazi u jednoj epidemiološkoj studiji u Nagano Prefecture, Japanu, gde je praćena aktivnost tokom nekoliko dekada. Istraživači su demonstrirali da je stepen smrtnosti farmera usled cancera čija je glavna okupacija bila gajenje *Flammulina Velutipes* (dobro poznate lekovite pečurke u Japanu) bio znatno manji nego kod ostale populacije u Prefecture (Ikekawa 1995, 2001). Još jedna slična obzervacija u Brazilu je dovela do pažljivog proučavanja- i popularnosti- *Agaricus blazei*.

Ja bih želeo da naglasim glavne tačke antitumorskih i imunomodulatorskih efekata polisaharida pečurki. Najvažniji medju njima su: (1) prevencija onkogeneze oralnom

upotrebom pečurki ;(2) direktno antitumorsko dejstvo na razne alogenske i singenske tumore; (3) imunopotencijaciono dejstvo na tumore u kombinaciji sa hemoterapijom; (4) preventivni efekat na metastazu tumora.

Japansko proučavanje popularnih jestivih i lekovitih pečurki, *Hypsizygus marmoreus*, (Ikekawa 2001), je jedan dobar primer preventivnog efekta.

Kontrolisani miševi su bili na jednoj običnoj dijeti, a tretirani miševi su bili na dijeti koja je sadržala 5% suvog ploda *H.marmoreus*. Svi miševi su bili špricani jakim carcinogenom „metil-holantrenom, i ispitivana je karcinogeneza miševa. Na kraju 76-to nedeljne observacije, 21 od 36 kontrolisanih miševa je razvilo tumor, ali je samo 3 od 36 tretiranih miševa i imalo tumor. Autori su zaključili da je pojava mehanizma cancera inhibitorna a dejstva jestivih pečurki canceropreventivna i to zbog imunopotencijacije (Ikekawa 2001).

Iz kliničke prakse je dobro poznato da polisaharidi pečurki najbolje rade u sprezi sa drugim formama «čvrste» hemoterapije i hirurgije, što je na žalost, veoma invazivno i ima puno negativnih sporednih efekata. Sa ovog aspekta najbolje je proučavan Lentinan, kako kod životinja tako i u ljudskoj kliničkoj praksi. U jednoj studiji ,275 pacijenata sa odmaklim ili obnovljenim gastro kancerom je podvrgnuto jednoj ili dveju vrstama hemoterapije (mitomicin C sa 5-fluorouracil ili tegafur) sa ili bez inekcija lentinana. Najbolji rezultati su dobijeni kada je lentinan dat pre hemoterapije kao i kod pacijenata sa primarnom lezijom i koji nisu do tada bili podvrgnuti hemoterapiji. Rezultati su procenjeni na bazi prolongiranja života, regresije tumora ili lezija, i poboljšanja imuniteta. (Hamuro i Chihara 1985; Hobbs 1995; Wasser i Weis 1997a)

Metastaza je jedan veoma ozbiljan i važan problem u kancero terapiji. Preventivni efekat ekstrakta pečurki na metastazu raka je proučavano od strane mnogih grupa, a naročito na Nacionalnom Kancer Centru Istraživačkom Institutu u Japanu. U nizu uspešno obavljenih eksperimenata, Lewis plućni carcinom je bio transplantiran u nogice miševa, a EA6 ili EA6-P II (polisaharidi iz *Flammulina velutipes*) je bilo administrovano u periodu od 10 dana. Životni vek tretirane grupe sa EA6-P II je bio značajno produžen (Ikekawa 2001) . Nastavljeno je dalje istraživanje upotrebom Meth-A fibrosarcoma: 7 dana nakon transplantacije tumora u abdomen ženke BALB/c miševa, čvrst tumor svake mišice je bio hiruški disektovan, a 7 dana nakon hiruške intervencije, drugi izazov sa istim tumorom, Meth-A –fibrosarcoma, je ubačen sa druge strane abdomena miša, a praćen je dalji rast i razvoj tumora. Rezultati su indicirali da je predtretman sa EA6 neznatno pospešio razvoj obnovljenog tumora, ali posttretman je bio značajno efektivan za inhibiciju rasta tumora kod doze od 10 mg/kg (Ikekawa 2001).

Specifične pripreme iz odredjenih lekovitih pečurki su prošle kroz puno testiranja na eksperimentisanom modelu životinja kao i na klinikama. Nakon izolacije lentinana iz *Lentinus edodes* (Chihara 1969), većina eksperimenata za testiranje antitumora je upravo izvedeno sa ovim polisaharidom. Njegoc «otac» , sam Chihara, je bio jedan od prvih istraživača koji su izvestili o antitumorskim karakteristikama lentinana. Originalno, njegov efekat je bio testiran uz upotrebu Sarcome 180 transplantovane u CD-1/ICD miša (Chihara i dr 1969, 1970)

Kasnije , lentinan je pokazao značajnu antitumorsku aktivnost ne samo kod alogenih tumora, već i kod raznih sinergiskih i autohtonih tumora (Hamuro i Chihara 1985). Inekcije lentinana su u miševima proizvele ili 80% manji tumor ili potpunu regresiju kod najvećeg broja testiranih životinja (Chihara 1981). Nakon toga je sledio niz kliničkih testova. Medju prvima je sledila studija o Fazi 3 kod pacijenata sa naprednim ili obnovljenim stomačnim kancerom (Wasser i Weis 1999; Ikekawa 2001). Terapija lentinanom je pokazala veoma

dobre rezultate u prolongiranju života pacijenata i nije imala toksične sporedne efekte.. Slični rezultati su dobijeni kod pacijenata sa kolorektalnim i grudnim kancerom. Od tada, lentinan je postao široko upotrebljavan lek i dijetetski dodatak u Japanu, drugim zemljama Dalekog Istoka, a kasnije i u Sjedinjenim Državama i Evropi.

PSK (komercionalno ime krestrina) ima značajnu imuno-dejstvo i široku antineoplastičnu aktivnost. Pokazalo se da je produženo vreme opstanka ozračenih miševa, stimulirano fagocitotično dejstvo makrofaga, i pojačane funkcije retikuloendotelialnog sistema (Zhu 1987). Imajući u vidu njegova antitumorska svojstva, on direktno deluje na ćelije tumora, kao i na domaćina indirektno pojačavajući njegov ćelijski imunitet (Hobbs 1995; Stamets 2000). On je pokazao svoje antitumorno dejstvo kod životinja sa adenosarkomom, fibrosarkomom, Mastocitomom, plazmacitomom, melanomom, sarkomom, karcinomom i žlezdnim, crevnim i kancerom pluća. (Sugimachi i dr. 1997) Jedna intrigirajuća karakteristika ove komponente je ta što je injekcija PSK sa jedne strane tumora pokazala da sprečava rast tumora sa druge strane tumora, što pomaže sprečavanju metastaze. PSK se koristi i oralno i intravenozno u kliničkoj medicini. Pokazao se veoma efektivnim u borbi protiv mnogih vrsta kancera (Hobbs 1995; Stamets 2000), ali retko sa zadovoljavajućim rezultatima u slučajevima kada se koristi sam.

Polisaharid schizophyllan pokazuje antitumorno dejstvo protiv i čvrstih i ascitnih formi Sarkome 180 , kao i protiv čvrstih formi sarkome 37, Erlich sarkome, Yoshida sarkome i Lewis plućnog karcinoma (Hobbs 1995). Schizoophyllan je takodje povećao ćelijski imunitet sprečavajući dejstvo ćelija ubica i dovodeći ih na normalan nivo kod miševa sa tumorom (Borchers i dr. 1999). Najbolji rezultati kod radijacije su bili postignuti kada se schizophyllan upotrebi ubrzo nakon ili za vreme radijacije, a schizophyllan zaustavlja mitozu ćelija koštane srži izazvane ranije korišćenjem antikancernih lekova. (Zhu 1987). Klinička proučavanja kod ljudi su pokazala beneficalno dejstvo tretmana schizophyllanom kod pacijenata sa gastričnim kancerom, faza 2 vratnim kancerom, i razvijenim vratnim karcinomom. (Hobbs 1995).

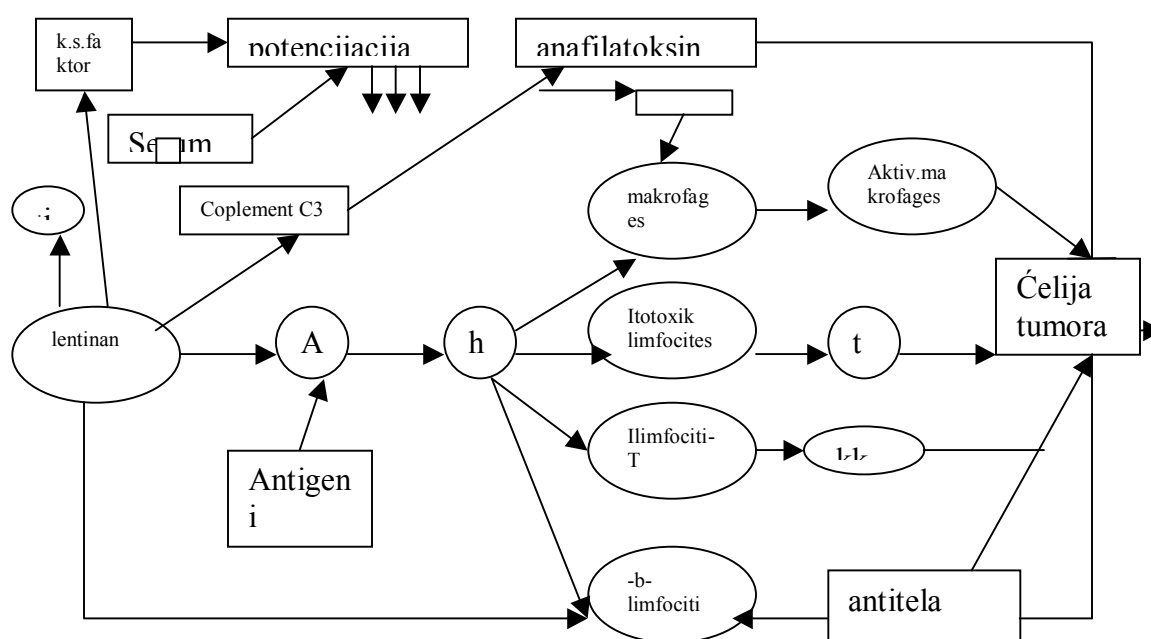
MEHANIZMI ANTITUMORNOG I IMUNOMODULATIVNOG DEJSTVA POLISAHARIDA PEČURKI

Polisaharidi pečurki vuku svoje antitumorno dejstvo uglavnom preko aktiviranja imunosistema organizma domaćina. Ove substance se smatraju biološkim modifikatorima (BRMs; Wasser i Weis 1999). Ovo u osnovi znači da : (1) ne izazivaju nikakvu štetu i ne stvaraju nikakav dodatni stres na telo; (2) pomažu telu da se prilagodi različitim prirodnim i biološkim stresovima; i (3) oni sprovode nespecifično dejstvo na telo, podržavajući neke ili sve glavne sisteme, uključujući nervni, hormonalni i imunosistem, kao i regulatorne funkcije. (Brekhman 1980)

Imunomodulativno dejstvo polisaharida pečurki je izuzetno vredno kao jedan profilaktički, blagi i neinvazivni oblik tretmana, i prevencija metastatičkih tumora, itd., kao što je opisano iznad. Polisaharidi iz pečurki ne napadaju ćelije raka direktno, već proizvode svoje antitumorno dejstvo aktiviranjem različitih imuno reakcija u domaćinu..Ovo je potvrđeno u mnogim eksperimentima, kao što je gubitak antitumornog dejstva polisaharida kod neonatalnih timektomiziranih miševa ili nakon administracije antilifocitnog seruma (Ooi

i Lui 1999). Takvi rezultati sugerišu da antitumorno dejstvo polisaharida zahteva očuvanu T-ćelijsku komponentu i da je ta aktivnost prožeta kroz timusnozavisni imuni mehanizam. Takodje, antitumorna aktivnost lentinana i drugih polisaharida je sprečena predtretmanom antimakrofagoagenansa (kao što je carrageenan). Stoga, različiti efekti polisaharida se javljaju zbog potencijacije reagovanja persekutora T ćelija i makrofagesa na citokine proizvedene od limfocita nakon apacificnog prepoznavanja ćelija tumora (Hamuro i Chihara 1985). Uz to, indukcija označenog porasta količine CFS, IL-1 i IL-3 polisaharida rezultira maturacijom, diferencijacijom i poliferacijom imunokomponentnih ćelija kod odbrambenih mehanizama domaćina. (Hamuro i Chihara 1985) Za polisaharide pečurki je poznato da stimulišu prirodne ćelije ubice, T-ćelije, B-ćelije i reakcije imunostistema na makrophage.

Slika 2. Mogući pravci delovanja lentinana (nakon Chihara 1981)



Za Lentinan se zna da je sposoban da restaurira potisnutu aktivnost pomoćnih T-ćelija u domaćinu koji ima tumor do njihove normalne veličine, vodeći do potpune restauracije humoralnog imuno reagovanja (Ooi i Lui 1999). To isto važi i za PSK, dok on nema substancijalni efekat na imuno reakcije domaćina pod normalnim uslovima.

Infiltracija eosinofila, neutrofila i granulocita oko targetnih tkiva je takodje ubrzana lentinanom. On aktivira sekreciju aktivnog oksigena i proizvodnju citokina u peritonealnim makrofagesa. Lentinan takodje povećava peritonealnu citotoksičnost u borbi protiv metastatičkih tumora; on može da aktivira normalne i alternativne staze komplementnog sistema i može da razdvoji C3 u C3a i C3b, pojačavajući makro aktivaciju. (Aoki 1984; Wasser i Weis 1997a; Hobbs 2000)

Lentinanska imunoaktivna sposobnost može biti povezana sa njegovom modulacijom hormonalnih faktora, za koje se zna da igraju ulogu u porastu tumora. Aoki (1984) je pokazao da je antitumorna aktivnost lentinana snažno smanjena administracijom tiroksina

ili hidrokortizona. Lentinan može također da restaurira zakasnele hipersenzitivne reakcije direktno antigenima i specifične za tumore.

Schizophyllan aktivira makrofage koji rezultiraju augmentacijom T-ćelija i njihovih aktivnosti, i povećava senzitivnost citotoksika LAK i NK ćelija na IL-2 (Mizuno 1996). Iako strukturalno sličan sa lentinanom, schizophyllan direktno ne aktivira T-ćelije (Hobbs). Moguće staze takvog delovanja za lentinan su rezimirane kod Chihara (1981) i Hamuro i Chihara, a preradjene od strane Wasser i Weis (1999), a one za β -D-glukan BRM su prikazane na sl. 2 i 3

IZABRANI PRIMERI VAŽNIH LEKOVITIH PEČURKI SA ANTITUMORNIM POLISAHARIDIMA U PLODOVIMA I MICELIJUMU KULTURE

Jedna od najvažnijih jestivih i lekovitih biotehnoških vrsta, poznata pod imenom A. Blazei je bila revalorizovana od strane naše grupe. Analize podataka o odgajanoj pečurki koja vodi poreklo iz Brazila, studija vrste materijala A. blazei, Murrill dokazuje dramatične razlike između njih. Na osnovu postojećih razlika predloženo je novo ime za široko kultivisanu pečurku – naučno ime *Agaricus brasiliensis*. S. Wasser i dr. A. blazei je Severno Američka endemska nekultivisana vrsta poznata samo sa tri lokacije – jedna na Floridi a dve u Južnoj Karolini (Wasser i dr 2002).

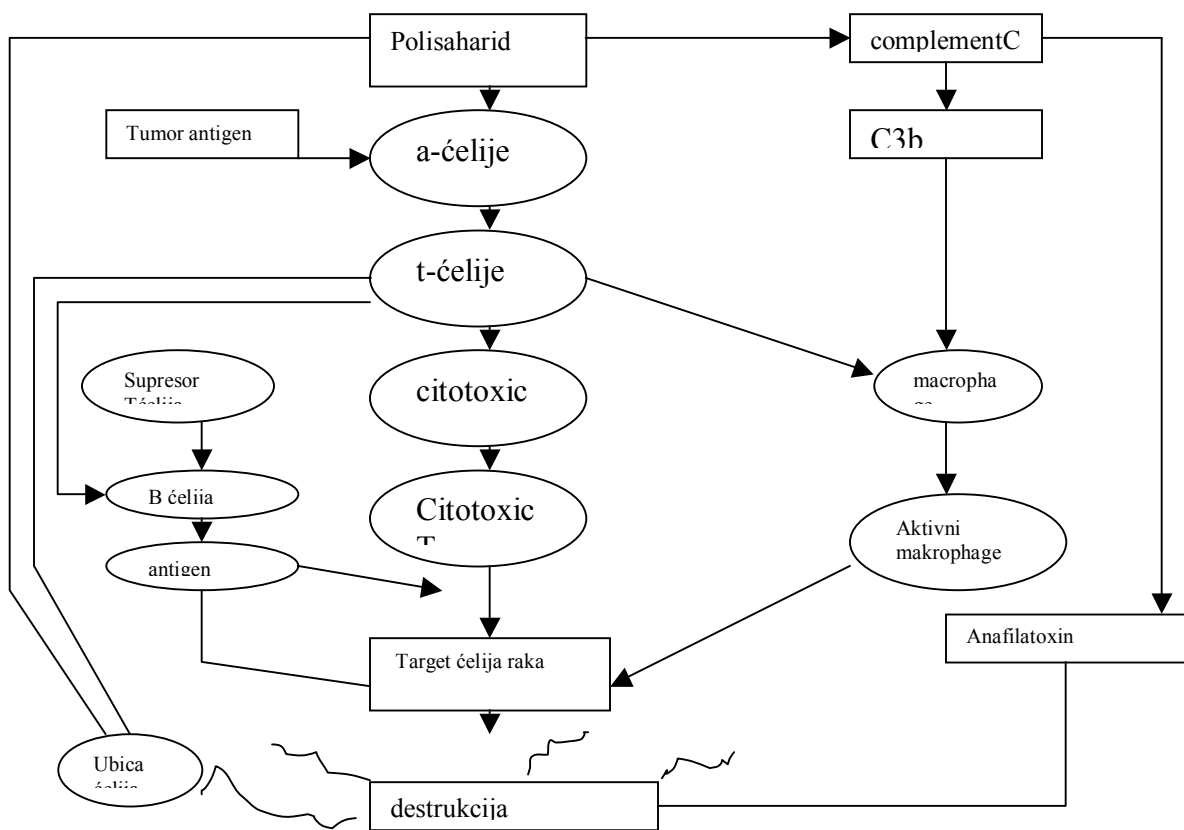
Agaricus blazei pečurka (the Royal Sun *Agaricus*, AMB, Himematsutake, Cogmelo de Dues) je jedna od novije otkrivenih lekovitih pečurki. Ova ukusna i jestiva pečurka se nalazi u malom delu planina Brazila, blizu grada Sao Paulo. Epidemiolozi koji proučavaju domaću populaciju u ovoj oblasti otkrili su da su lokalni meštani oboljevali od vrlo malog broja bolesti, uključujući i kancere kao i virusne i bakteriološki izazvane bolesti, a disproporcionalno visoki broj je imao jako dug život. Na kraju je ovo povezano sa konstantnom konzumacijom – a. Blazei pečurki tokom njihovo uobičajene dijeta. Tokom 1980-tih i 1990-tih, A. blazei je prihvaćena kao stimulant imuno sistema, koji podstiče telesne prirodne obrambene mehanizme da se bore protiv raznih infektivnih agenasa i uslova, uključujući i kancere. Imunostimulativno dejstvo i antitumorna aktivnost A. Blazei pečurke je ispitivano u različitim laboratorijskim modelima, uključujući Sarcoma 180 i (Meth-A) fibrosarcoma miševa sa tumorom (Kawagishi i dr. 1989, 1990; Mizuno i dr. 1990b, 1998; Mizuno 2002; Itoh i dr 1994; Ebina i Fujimiya 1998; Fujimiya i dr 1998a, 2000; Stamets 2000). Od 17 polisaharidskih frakcija dobijenih iz A. blazei plodova (Mizuno i dr. 1990a; Mizuno 2002) 7 je pokazalo antitumorsko dejstvo. Analize fizikohemijskih karakteristika vodorastvorljivih polisaharidskih frakcija koje imaju visoko antitumorno dejstvo su pokazale da su njihove glavne komponente bile β -(1-6)-; β -(1-3)-glukan, asidic β -(1-6)-; α -(1-4)-glukan (Mizuno i dr. 1990a). A. blazei je bila prva pečurka za koju je utvrđeno da poseduje antitumorski glukan sa β -(1-6)-povezanom kičmom, za razliku od ostalih poznatih β -(1-3)glukana.

Antitumorni proteoglukan HM3-G iz A. blazei pečurke, koji prožima aktivaciju prirodnog ubica ćelija i apoptozu, ima molekularnu masu od 380kDa i sastoji se od više od 90% glukoze a glavna komponenta je α -(1-4)-glukan sa β -(1-6)- deljenim, pri odnosu od otprilike 4:1 (Fujimiya i dr. 1998b). Jako je interesantno napomenuti da je frakcija niske molekularne težine, LM-3, sa prosečnom težinom od 20kDa, sastavljena od α -(1-4)glukan sa β -(1-6)-deljenim, također pokazala tumorsko-specifične citocidalne i imunopotencijativne efekte (Fujimiya i dr. 1999), dok čisti glukan dobijen iz antitumor β -(1-6)-glukan-proteinskoga kompleksa izolovanog iz vodeno-nerastvorljivog ostatka A. blazei plodova, nije pokazao

jaku aktivnost (Kawagishi i dr. 1990). Tri imunostimulativna heteroglukana (AG-2, -3 i -6) su bila ekstrahovana sa 0.9% sodium hloridom i vrućom vodom iz plodova *A. blazei* iz od šest dobijenih polisaharida (Cho i dr. 1999). AG-2 i AG-3 su bili sastavljeni od glukoze, galaktoze i manoze u molarnim odnosima 74,0 :15,3 :10,7 i 63,6 :17,6 :12,7 pojedinačno; a AG-6 je bio sastavljen od glukoze i riboze pri molarnom odnosu od 81,4 : 12,6.

Ksiloglukan (Yyl:Glc, molarni odnos = 2:10) koji je sadržao 9% protein dobijen procesom frakcije i purifikacije *A. blazei* ekstrakta, pokazao je značajnu aktivnost protiv Sarcome 180 kod miševa (Mizuno 2002).

Slika 3. Mogući imuno mehanizam: β -D-glukan biološki reagujući modifikator (BRM) (nakon Mizuno 2002)



Ne samo plodovi već i micelijumi kulture *A. blazei*, izvor su antitumornih saharida. Jedna antitumorna organska supstanca po imenu ATOM razvijena je iz *A. Blazei* (Iwade strain 101), koji je PSPC (Ito i dr. 1997.) Još jedan PSPC, 0041, je dobijen iz proizvedenog micelija kulture; glavne komponente ovog polisaharida su glukoza i manozna (Hikichi i dr. 1999). Novi antitumorni polisaharid, aktivan na Sarcoma 180, je ne tako davno izdvojen iz tečnosti miceliuma kulture *A. blazei*: β -(1-2); β -(1-3)-glukomanan (Tsuchida i dr. 2001). Ovaj polisaharid izgleda potpuno drugačije od antitumornih polisaharida iz plodova *A. Blazei* (Mizuno i dr. 1999b).

Filtrat tečnog medijuma izdvojen iz miceliuma nakon kultivacije *A. blazei* sadržao je manan-proteinski kompleks (AB-FP) sa molekularnom težinom od 10 na 5 – 10 na 7 Da i jednu malu količinu glukoze, galaktoze i riboze. AB-FP je bio 575 mg/l filtrat tečnog medijuma, i posedovao je značajnu antitumornu aktivnost. (Mizuno 2002)

Stoga, antitumorni polisaharidi, ispitivani u plodovima *A. blazei*, miceliumu kulture, ili proizvedeni ekstra-ćelijski u kulturi imaju različitu hemijsku strukturu. Polisaharidi iz plodova su predstavljali glukane sa različitim vrstama veza glukozne jedinice ili heteroglukona; micelie kulture su sadržale glukomanane, a manan-proteinski kompleks je bio proizveden u medijumu kulture tokom potopljene kultivacije.

Ganoderma tsugae je još jedna lekovita pečurka kod koje su polisaharidi vrlo dobro ispitivani kako u plodovima tako i u miceliumu. Dobijeno je sedam glikana sa jakim antitumornim dejstvom iz 14 vodorastvorljivih i 15 vodonerastvorljivih frakcija ekstrahovanih iz *G. Tsugae* plodova (Wang i dr. 1993). Vodorastvorljive frakcije su bili glukogalaktani koji su sadržali proteine povezane sa manozom i fukozom, a vodonerastvorljive frakcije su predstavljale β -(1-3)-glukane sa različitim proteinskim sadržajem.

Šesnaest vodorastvorljivih polisaharida je bilo ekstrahovano iz *G. Tsugae* miceliuma i ispitivano zbog antitumornih efekata na Sarcoma 180 kod miševa. (Zhang i dr. 1994b). Dobijena su tri aktivna polisaharida i to: glukan-proteinski kompleks koji sadrži 9.3% proteina, a heteropolisaharidom od manoze i ksiloze; glukan-proteinski kompleks koji sadrži 25,8% proteina; i glikan-protein sa glukozom kao glavnim sastojkom, a u sprezi sa arabinozom, manozom, xilozom, i galaktozom. Poređenje aktivnih vodorastvorljivih polisaharida dobijenih iz plodova i miceliuma je pokazalo da oni dobijeni iz plodova su bili glukogalactan-proteinski kompleksi, dok su oni iz miceliuma bili homoglukan-proteinski kompleksi ili jedan heteroglikac sastavljen od manoze i xiloze.

Grifola frondosa je jedna od najpopularnijih lekovitih pečuraka.

Plodovi ove pečurke se sastoje od β -(1-3)-; β -(1-6)-glukana, asidnog β -D-glukana (Mizuno i dr. 1986; Jong i Birmingham 1990; Wasser i Weis 1999), i β -(1-6)- β -(13)-glukana (Nanba i dr. 1987) u frakciji vodorastvorljivog polisaharida. Vodonerastvorljive frakcije uključuju jedan asidni xiloglukan sa Glc:Xyl molarnim odnosom 100:82 i 16.5% glukonskom kiselinom; aksidni heteroglikan koji sadrži 3.8% protein, komponentne šećere Glc:Xyl:Man:Fuc (100:58:34:14); i tri asidna glikoproteina sa molekularnom masom od 20-100 kDa. Glavna komponenta šećera je glukoza, dok su fukoza, xiloza, manosa i galaktoza samo manje komponente (Mizuno i dr. 1986). Stoga, svi detektovani polisaharidi u *G. frondosa* plodovima su β -glukani sa različitom lančanom konformacijom, heteroglukani, ili glukoproteini.

Nasuprot polisaharidnoj kompoziciji u plodovima, β -glukan nije bio otkriven kod antitumornih aktivnih frakcija dobijenih iz micelium kulture (nastale na Whatman filter papiru natopljenim tečnim nutritivnim medijumom) i sakupljen pre inicijacije postanka plodova (Mizuno i Zhuang 1995). Kod vodorastvorljivih frakcija pronadjeni su fukogalactomanan-proteinski kompleks, galaktoglukocomanan, manogalactofukan, i galactoglukomanofucan-proteinski kompleks. Kod vodonerastvorljivih frakcija pronadjeni su manofukoglukoxilan, manoglukofukoxilan-proteinski kompleks, manofukoglukoxilan-proteinski kompleks i glukomanofukoxilan-proteinski kompleks. (Zhuang i dr 1994a) Stoga, polisaharidi iz *G. Frondosa* su heteromani, heterofukani, i heteroxilani, ili njihovi kompleksi sa proteinom, tj. tipom polisaharida koji nije pronadjen u plodovima ove pečurke.

Moramo napomenuti da struktura polisaharida kod miceliuma kulture može zavisiti od kompozicije nutritivnog medijuma koji se koristi kod kultivacije. Stoga, Ohnoi i njegovi saradnici (1985, 1986) su zaključili da antitumor je glukan grifolan ekstrahovan iz miceliuma kulture *G. Frondosa* β -(1-3)-, β -(1-6)-glukan, isti kao i kod ploda ove pečurke. U ovom eksperimentu, čista kultura je rasla u tečnom medijumu u stacioniranoj kulturi ili uz tresuću. Dobijeni micelium je bio dodatno kultiviran još 3 dana u puferu sastavljenom od glukoze (5%) i limunske kiseline, pH 4.5. Dobijeni su antitumor aktivni β -(1-3)-, β -(1-6)-glukani iz ekstrakcije micelija gajenog na nutritivnom medijumu i alkoholnom precipitacijom supernatanta pufera (Adachi i dr. 2002)

Tabela 4
Broj frakcija polisaharida dobijenih iz različitih Basidiomycetesa

Vrste	Plod	Micelium kulture	Literatura
<i>Agaricus blazei</i>	17		Mizuno i dr 1990
<i>Hericium erinaceus</i>	15		Mizuno 1999b
<i>Grifola frondosa</i>	29	28	Mizuno, Cun Zhung1994
<i>Hohenbuehelia serotina</i>	20		Ma i dr. 1991
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	21		Zhuang i dr.1993
<i>Pleurotus citrinopaxillus</i>	21		Zhuang i dr. 1994a
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	24		Mizuno i dr.1995a
<i>Lyophyllum decastes</i>	11		Ukawa i dr. 2000
<i>Inonatus obliquus</i>	21	8	Mizuno i dr. 1999a
<i>Ganoderma tsugae</i>	29	19 *	Wang 1993;Zhang 1994b

*Broj frakcija samo vodenorastvorljivih polisaharida

Broj polisaharida ekstrahovanih iz plodova odgajanog miceliuma iste vrste umnogome zavisi od metoda frakcionacije koja se koristi, ali, uopšteno, ukupna količina polisaharida u plodovima je veća. (Tabela 4).

Broj frakcija označenih na Tabeli 4 podrazumeva, u nekim slučajevima, ne samo finalne purificirane polisaharide već takodje i neke intermedijatne frakcije koje su bile testirane na antitumornu aktivnost.

Proporcija frakcija biološki aktivnih polisaharida u plodovima i miceliuma kulture je veoma visoka. Zato, 20 od 29 frakcija polisaharida dobijenih iz *G. frondosa* plodova je pokazalo različite nivoe antitumorne aktivnosti (Mizuno i dr. 1986), a 24 od 28 frakcija polisaharida dobijenih iz miceliuma kulture ove pečurke je pokazalo antitumornu aktivnost (Zhuang i dr.1994a).

Ukupan broj polisaharida ekstrahovanih iz ploda je uglavnom veći od onog dobijenog iz miceliuma kulture. Na primer, ukupan broj vodorastvorljivih i vodonerastvorljivih polisaharida dobijenih iz *I. Obliquus sclerotium* je 2-3 veći od onog ekstrahovanog iz miceliuma kulture. (Tabela 5).

ZAKLJUČCI

Više Basidiomycetes pečurke su još uvek detaljno neispitane; iako je inventar poznatih vrsta nekompletan, dosadašnje poznate vrste su samo oko 10% od stvarnog broja (Hawksworth 2001). Broj pečurki sa poznatim farmakološkim kvalitetima je još uvek mnogo manji. Međutim, do sada proučavane vrste predstavljaju veliki izvor antikanceranih i imunostimulativnih polisaharida. Mnoge, ako ne i sve, Basidiomycetes pečurke sadrže biološki aktivne polisaharide. Od 651 vrste i 7 infraspecifičnih taksu iz 182 roda viših Hetero- i Homobasidiomycete, najveći broj njih je pokazalo da u sebi poseduje farmakološki aktivne polisaharide u plodovima, miceliumu kulture ili kuvanoj tečnosti ploda (Reshetnikov i dr. 2001).

Polisaharidi pečuraka su različite hemijske strukture, i uglavnom pripadaju grupi β -glukana (Mizuno 1999a, 2000). Antitumorni polisaharidi iz raznih pečuraka se odlikuju svojom molekularnom težinom, stepenom granjanja, ili višom (tercijalnom) strukturom. Evidentno je da su takve strukturalne karakteristike kao β -(1-3) spojevi u glavnom lancu glukana i dodatne β -(1-6) granske tačke neophodne za antitumorno dejstvo. β -glukani koji sadrže uglavnom (1-6) spojeve imaju manju aktivnost. Veća molekularna težina glukana postiže veću efektivnost nego oni sa manjom molekularnom težinom (Mizuno 1996, 1999a, b). Za razliku od β -(1-3) glukana, α -(1-3)-glukuronoxilomanani, koji su karakteristični za žele pečurke, ne zavise previše od molekularne težine.

Tabela 5

Proizvod frakcija polisaharida iz sclerotie i miceliuma kulture *Inonotus obliquus* (posle Mizuno i dr. 1999b)

Vodorastvorljivi polisaharidi, g/kg suve težine		Vodonerastvorljivi polisaharidi, g/kg suve težine	
Sclerotium			
FIS-I	164,5	FII	2,64
FIS-II	12,0	FIII-1	42,48
		FIII-2	87,84
Mycelium			
FI	53,9	FII	43,15
		FIII-1	4,6
		FIII-2	21,1

Postoje različiti pristupi za pojačavanje antitumornog dejstva polisaharida pečuraka hemijskom modifikacijom, koja je takodje neophodna za poboljšavanje njihovih kliničkih kvaliteta, rastvorljivosti u vodi i mogućnosti prožimanja zidova stomaka nakon oralnog konzumiranja. Dve glavne procedure za kliničko poboljšanje su: modifikacija polisaharida pečurki Smitovom degradacijom (Oxido-reducto-hidroliza) i aktiviranje metodom formolize. Najuspešnije šeme za ove metode su razvijene za *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* i *Leucopaxillus giganteus* (= *Tricholoma gigantea*). Karboksimetilacija je još jedna hemijska metoda koja transformiše β -glukane u vodorastvorljivu formu.

Postoji takodje puno eksperimentalnih i kliničkih dokaza sa beneficijalnim rezultatima polisaharida pečuraka za sledeće namene: (1) prevencija onkogeneze oralnim konzumiranjem pečuraka ili obradjenih; (2) direktno antitumorno dejstvo na različite alogenske i sinogenske tumore; (3) imunopotencijalna aktivnost na tumore u sprezi sa hemoterapijom; (4) preventivni efekti na metastazu tumora. Većina kliničkih dokaza dolazi iz komercijalnog polisaharida lentinana, PSK (krestin), i schizophylana, ali takodje nadolaze novi podaci za polisaharide iz *Phellinus linteus*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus*, *A.blazei* i druge.

Biohemijski mehanizmi koji pojačavaju biološku aktivnost polisaharida još uvek nisu potpuno razjašnjeni. Polisaharidi iz pečuraka ne napadaju direktno ćelije raka, već proizvode svoje antitumorne efekte aktiviranjem različitih imuno responsa kod domaćina.

Antitumorno dejstvo polisaharida zahteva jednu kompaktnu T-ćelijsku komponentu; njihova aktivnost je prožeta kroz timus-zavisni imunomehanizam (Borchers i dr. 1999)

Polisaharidi pečurki su poznati kao stimulatori prirodnih ubica ćelija, T-ćelija, B-ćelija, i makrofage-zavisnih imunosistemskih responsa.

Imunomodulativno dejstvo polisaharida pečuraka je naročito važno kao sredstvo profilaksise, blage i neinvazivne forme tretmana, prevencije metastatičkih tumora, i kao jedan uporedni tretman sa hemoterapijom.

Otkriven je široki spektar biološki aktivnih polisaharida medju višim Basidiomycetes pečurkama, a njihova praktična primena zavisi ne samo od njihovih jedinstvenih svojstava već i od biotehnoloških mogućnosti. Izolacija i purifikacija polisaharida iz pečurki je relativno jednostavna i može se izvesti uz minimalni napor (Mizuno 1996, 1999a) Micelia formirana tokom rasta čiste kulture u pripremljenim uslovima ima konstantnu strukturu, a pripremljena kultura je najbolja tehnika za postizanje konsistentnog i sigurnog proizvoda pečurki (Wasser i dr. 2000; Reshetnikov i dr. 2001).

LITERATURA

References

- Adachi Y, Suzuki Y, Jinushi T, Yadomae T, Ohno N (2002) TH1-oriented immunomodulating activity of gel-forming fungal (1-3)-Beta-Glucans. *Int J Med Mushrooms* 4:105-120
- Aoki T (1984) Lentinan. In: Fenichel RL, Chirgis MA (eds) *Immune modulation agents and their mechanisms*. *Immunol Stud* 25:62-77
- Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin EM (1999) Mushrooms, tumors, and immunity. *Soc Exp Biol Med* 221:281-293
- Brekhman II (1980) *Man and biologically active substances*. Pergamon Press, New York
- Chang ST (1999) Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int J Med Mushrooms* 1:1-8
- Chang ST, Miles PG (1992) Mushroom biology - a new discipline. *Mycologist* 6:64-65
- Chihara G (1981) The antitumor polysaccharide Lentinan: an overview. In: Aoki T et al (eds) *Manipulation of host defence mechanisms*. *Excerpta Med, Int Congr Ser 576*, Elsevier, Amsterdam
- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fumiko F (1969)

Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Nature 222:687–688

Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Arai Y, Fukuoka F (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes*. Cancer Res 30:2776–2781

Cho SM, Yu SH, Shin GC (1996) Biological activities of culture broth of some wood rotting basidiomycetes. Antimicrobial, plant growth regulatory, antitumor, and enzymatic activities. Korean J Mycol 24:17–24

Cho SM, Koshino H, Yu SH, Yoo ID (1998) A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.). Carbohydr Polym 37:13–18

Cho SM, Park JS, Kim KP, Cha DY, Kim HM, Yoo ID (1999) Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. Korean J Mycol 27:170–174

Chung KS, Choi EC, Kim BK, Kim YS, Park YK (1982) The constituents and culture of Korean Basidiomycetes: antitumor polysaccharides from the cultured mycelia of some Basidiomycetes. Arch Pharmacol Res (Seoul) 5:17–20

Cun Z, Mizuno T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Kawade M (1994) Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. J Jpn Soc Food Sci Technol 41:724–732

Ebina T, Fujimiya Y (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. Biotherapy 11:259–265

Fujii T, Ishida N, Maeda H, Mizutani I, Suzuki F (1979) KS-2-A. US Patent 4163780, 8 July 1979

Fujimiya Y, Kobori H, Oshiman KI, Soda R, Ebina T (1998a) Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 45:246–252

Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman KI, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R (1998b) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. Cancer Immunol Immunother 46:147–159

Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R, Ebina T (1999) Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill. Anticancer Res 19:113–118

Fujimiya Y, Yamamoto H, Noji M, Suzuki I (2000) Peroral effect on tumor progression of soluble β -(1, 6)-glucans prepared by acid treatment from *Agaricus blazei* Murr. (Agaricaceae, Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms 2:43–49

Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S (2000) Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide). Mol Urol 4:7–13

Gao QP, Jiang RZ, Chen HQ, Jensen E, Seljelid R (1996a) Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. Planta Med 62:297–302

Gao QP, Seljelid R, Chen HQ, Jiang R (1996b) Characterization of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk. with cytokine stimulating activity. Carbohydr Res 288:135–142

Gao QP, Killie MK, Chen HQ, Jiang RZ, Seljelid R (1997) Characterization and cytokine-stimulating activities of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis*. Planta Med 63:457–460

Gasiorowski K, Brokos B, Lamer ZE, Trocha GJ (1993) Polysaccharides

from *Laetiporus sulphureus* (Basidiomycetes) II. Evaluation of immunostimulative and antitumor activity. Bull Pol Acad Sci Biol Sci 41:347–352

Ghoneum M, Wimbley M, Salem F, McKlain A, Attallah N, Gill G (1995) Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC). Int J Immunother 11:23–28

Gorin PAJ, Barreto-Berger E (1983) The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: Aspinall GO (ed) The polysaccharides, vol 2. Academic Press, Orlando, Fla. pp 365–409

Gutiérrez A, Prieto A, Martínez AT (1996) Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. Carbohydr Res 281:143–154

Hamuro J, Chihara G (1985) Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator: its experimental and clinical applications and possible mechanism of immune modulation. In: Fenichel RL, Chirigos MA (eds) Immunomodulation agents and their mechanisms. Dekker, New York, pp 409–436

Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yag KH, Kim HM (1999) The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacol 41:157–164

Hara C, Kumazawa Y, Inagaki K, Kaneko M, Kiho T, Ukai S (1991) Mitogenic and colony stimulating factor-inducing activities of polysaccharide fractions from the fruit bodies of *Dictyophora indusiata* Fisch. Chem Pharm Bull (Tokyo) 39:1615–1616

Hawksworth DL (1993) The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. In: Isaac S, Frankland JC, Watling R, Whalley AJS (eds) Aspects of tropical mycology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 265–293

Hawksworth DL (2001) Mushrooms: the extent of the unexplored potential. Int J Med Mushrooms 3:333–340

Hikichi M, Hiroe E, Okubo S (1999) Protein polysaccharide 0041. European Patent 0939082, 9 January 1999

Hirata A, Itoh W, Tabata K, Kojima T, Itoyama S, Sugawara I (1994) Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan. Biosci Biotechnol Biochem 58:406–407

Hiroshi S, Takeda M (1993) Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. In: Chang ST, Buswell JA, Chiu SW (eds) Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press, Hong Kong, pp 237–245

Hobbs C (1995) Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture. Botanica Press, Santa Cruz, Calif.

Hobbs C (2000) Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A literature review. Int J Med Mushrooms 2:287–302

Ikekawa T (1995) Enokitake, *Flammulina velutipes*-host-mediated antitumor polysaccharides. Food Rev Int 11:202–206

Ikekawa T (2001) Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. Int J Med Mushrooms 3:291–298

Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F (1969) Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. Cancer Res 29:734–735

Ikekawa T, Ikeda Y, Yoshioka Y, Nakanishi K, Yokoyama E, Yamazaki E (1982) Antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* 2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5. J Pharmacobiol Dyn 5:576–581

Ikekawa T, Saitoh H, Feng W, Zhang H, Li L, Matsuzawa T (1992) Antitumor activity of extracts and polysaccharides. Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:1954–1957

Ishiyama D, Kawagishi H, Furukawa S, Mori Y, Kojima F, Okamoto K, Sakamoto H (1996) Eudesmane derivative and

neurocyte factor-producing inducer containing the same as active ingredient. Japanese Patent 8073395, 19 March 1996

Ito H, Sugiura M, Miyazaki T (1976) Antitumor polysaccharide fraction from the culture filtrate of *Fomes fomentarius*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 24:2575

Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M (1997) Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. Anticancer Res 17:277-284

Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H (1994) Inhibitory action of a (1-6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. Jpn J Pharmacol 66:265-271

Itoh W, Sugawara I, Kimura S, Tabata K, Hirata A, Kojima T, Mori S, Shimada K (1990) Immunopharmacological study of sulfated schizophyllan (SPG) I: Its action as a mitogen and anti-HIV agent. Int J Immunopharmacol 12:225-234

Jong SC, Birmingham JM (1990) The medicinal value of the mushroom *Grifola*. World J Microbiol Biotechnol 6:101-127

Kanayma H, Togami M, Adachi N, Fukai Y, Okumoto T (1986) Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poria cocos*: III. Antitumor activity against mouse tumors. Yakugaku Zasshi 106:307-312

Karácsonyi S, Kuniak L (1994) Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble D-glucan. Carbohydr Polym 24:107-111

Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Hakamura T (1989) Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr Res 186:267-274

Kawagishi H, Kanao T, Inagaki R, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Hakamura T (1990) Formulation of a potent antitumor (1-6)-beta-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. Carbohydr Polym 12:393-404

Kidd PM (2000) The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. Altern Med Rev 5:4-27

Kiho T, Nagai YS, Sakushima M, Ukai S (1992a) Polysaccharides in fungi: XXIX. Structural features of two antitumor polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:2212-2214

Kiho T, Shiose Y, Nagai K, Ukai S (1992b) Polysaccharides in fungi: XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:2110-2214

Kiho T, Yoshida I, Katsuragawa M, Sakushima M, Usui S, Ukai S (1994) Polysaccharides in fungi: XXXIV. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated product. Biol Pharm Bull 17:1460-1462

Kim BK, Choi EC, Chung KS, Kang CY, Kim SH, Kim JS, Kim YJ, Lee KL, Lee JK (1982) The constituents of higher fungi of Korea: antitumor polysaccharides from the carpophores of some Basidiomycetes. Arch Pharmacol Res (Seoul) 5:21-24

Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID (1996) Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int J Immunopharmacol 18:295-303

Kim YS, Park KS, Park HK, Kim SW (1994) Compositional sugar analysis of polysaccharides by high performance liquid chromatography

and gas chromatography. Arch Pharmacol Res (Seoul) 17:337–342

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 9th edn. CAB International, Wallingford

Kosuna K (1998) Polysaccharides and preparation thereof. US Patent 5756318, 26 May 1998

Kuniak L, Karácsonyi S, Augusti J, Ginterová A, Széchenyi S, Kravarik D, Dubaj J, Varjú J (1993) A new fungal glucan and its preparation. World Patent 9312243, 24 June 1993

Liou YF, Lin KH (1979) Preparation of polysaccharides from *Fomes japonicus* (Fr.) Sacc. – screening for antitumor and cytotoxic substances. Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi 78:549–557

Liu F, Ooi VEC, Liu WK, Chang ST (1996) Immunomodulation and antitumor activity of polysaccharide-peptide complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. Gen Pharmacol 27:621–624

Lorenzen K, Anke T (1998) Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. Curr Org Chem 2:329–364

Ma Y, Mizuno T, Ito H (1991) Antitumor activity of some polysaccharides isolated from a Chinese mushroom, “Huangmo”, the fruiting body of *Hohenbuehelia serotina*. Agric Biol Chem 55:2701–2710

272

Maeda YY, Watanabe ST, Chihara C, Rokutanda M (1988) Denaturation and renaturation of a β -1,6; 1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses. Cancer Res 48:671–675

Marchessault RH, Deslandes Y, Ogawa K, Sundarajan PR (1977) X-ray diffraction data for β -D-glucan. Can J Chem 55:300–303

Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obara M, Kobayashi M, Li YQ, Hosokawa M (1998) Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. Anti Cancer Drugs 9:343–350

Min HK, Choi EC, Kim BK (1980) Studies on the constituents of the higher fungi of Korea: 18. Components of *Russula pseudodelicia* and *Microporus affinis*. Korean J Mycol 8:13–20

Misaki A, Nasu M, Sone Y, Kishida E, Kinoshita C (1986) Comparison of structure and antitumor activity of polysaccharides isolated from Fukurotake, the fruiting body of *Volvariella volvacea*. Agric Biol Chem 50:2171–2184

Miyazaki T, Nishijima M (1981) Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 29:3611–3616

Miyazaki T, Yadomae T, Terui T, Yamada H, Kikuchi T (1975) Studies on fungal polysaccharide. XVII. A new glucuronan “protuberic acid” produced by a fungus *Kobayasia nipponica*. Biochim Biophys Acta 385:345–353

Mizuno M, Shiomi Y, Minato K, Kawakami S, Ashida H, Tsuchida H (2000) Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. Immunopharmacology 46:113–121

Mizuno T (1996) Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods Food Ingrid J Jpn 167:69–85

Mizuno T (1999a) The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. Int J Med Mushrooms 1:9–29

Mizuno T (1999b) Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. Int J Med Mushrooms 1:105–119

Mizuno T (2000) Development of an antitumor biological response

modifier from *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 2:21–33

Mizuno T (2002) Medicinal properties and clinical effects on *Agaricus blazei* Murr. *Int J Med Mushrooms* 4:(in press)

Mizuno T, Zhuang C (1995) Maitake, *Grifola frondosa*: pharmacological effects. *Food Rev Int* 11:135–149

Mizuno T, Ohsawa K, Hagiwara N, Kuboyama R (1986) Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric Biol Chem* 50:1679–1688

Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A (1990a) Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agric Biol Chem* 54:2889–2896

Mizuno T, Inagaki R, Kanao T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A (1990b) Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agric Biol Chem* 54:2897–2906

Mizuno T, Ando M, Sugie R, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Matsuura A (1992) Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:34–41

Mizuno T, Ma Y, Ito H, Suzuki C (1994) Water insoluble polysaccharide originating in mushroom, its production, and antitumor agent mainly comprising the polysaccharide. Japanese Patent 06–080703, 22 March 1994

Mizuno T, Kinoshita T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi Y (1995a) Antitumor-active heteroglycans from Niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:568–571

Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, Kawagashi H (1995b) Antitumoractive substances from mushrooms. *Food Rev Int* 11:23–61

Mizuno T, Yeohlui P, Kinoshita T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi Y (1996) Antitumor activity and chemical modification of polysaccharides from Niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:30–33

Mizuno T, Morimoto M, Minato KI, Tsuchida H (1998) Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:434–437

Mizuno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kiho T, Ukai S, Leclerc S, Meijer L (1999a) Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 1:301–316

Mizuno T, Minato K, Ito H, Kawade M, Terai H, Tsuchida H (1999b) Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochem Mol Biol Int* 47:707–714

Nakajima K, Hirata Y, Uchida H, Watabe Y, Taniguchi T, Obayashi A, Tanabe O (1980) Polysaccharides having anticarcinogenic activity and method for producing same. UK Patent 2031446, 23 April 1980

Nakashima S, Umeda Y, Kanada T (1979) Effect of polysaccharides from *Ganoderma applanatum* on immune response. I. Enhancing effect on the induction of delayed hypersensitivity in mice. *Microbiol Immunol* 23:501–513

Nakayoshi H, Watanebe T, Yamamura Y, Ono M (1968) Suppression of Sarcoma 37 in mice by the treatment with extracellular polysaccharide produced by a strain of *Crepidotus* sp. *Jpn J Exp Med* 38:437–442

Nanba H (1998) Proteoglycan and antidiabetic drug. Japanese Patent 10–182702, 7 July 1998

Nanba H, Hamaguchi A, Kuroda H (1987) The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 35:1162–1168

Ohno N, Iino K, Takeyama T, Suzuki I, Sato K, Oikawa S, Miyazaki T, Yadomae T (1985) Structural characterization and antitumor activity of the extracts from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33:3395–3401

Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, Sato K, Oikawa S, Yadomae T (1986) Characterization of the antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34:1709–1715

Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T (2000) Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull* 23:866–872

Ohtsuka S, Ueno S, Yoshikumi C, Hirose F, Ohmura Y, Wada T, Fujii T, Takahashi E (1973) Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. UK Patent 1331513, 26 September 1973

Ohtsuka S, Ueno S, Yoshikumi C, Hirose F, Ohmura Y, Wada T, Fujii T, Takahashi E (1977) Polysaccharides and method for producing same. US Patent 4051314, 27 September 1977

Okamura K, Suzuki M, Chihara T, Fujiwara A, Fukuda T, Goto S, Ichinohe K, Jimi S, Kasamatsu T (1986) Clinical evaluation of schizophyllan. *Cancer* 58:865–872

Ooi VEC, Liu F (1999) A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushrooms* 1:195–206

Paulik S, Svrček, Mojišová J, Durove A, Benišek Z, Húska M (1996) The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. *J Vet Med B* 43:129–135

Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK (2001) Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mushrooms* 3:361–394

Saito K, Nishijima M, Miyazaki T (1989) Studies on fungal polysaccharides: XXXV. Structural analysis of an acidic polysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37:3134–3136

273

Wasser SP, Didukh MY, Meijer A de, Amazonas MALL de, Nevo E, Stamets P (2002) Is widely cultivated culinary-medicinal mushroom indeed *Agaricus blazei* Murrill? *Int J Med Mushrooms* 4 (in press)

Yadomae T (2000) Structure and biological activities of fungal ©-1,3-glucans. *Yakugaku Zasshi* 120:413–431

Yadomae T, Ohno N (2000) *Sparassis crispa* Fr. extract. Japanese Patent 2000–217543, 8 August 2000

Yanaki T, Ito W, Tabata K, Kojima T, Norizuye T, Takano N, Fujita H (1983) Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophys Chem* 17:337–342

Yanaki T, Ito W, Tabata K (1986) Correlation between antitumor activity of schizophyllan and its triple helix. *Agric Biol Chem* 509:2415–2416

Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H (1987) Icons of medicinal fungi from China (translated, Yuehan X). Science Press, Beijing

Yoshida I, Kiho T, Usui S, Sakushima M, Ukai S (1996) Polysaccharides in fungi. XXXVII. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1–3)-alpha-D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea*

and *Amanita muscaria*. Biol Pharm Bull 19:114–121

Yoshioka Y, Ikekawa T, Nida M, Fukuoka F (1972) Studies on antitumor activity of some fractions from basidiomyces. I. An antitumor acidic polysaccharide fraction of *P. ostreatus* (Fr.) Quéf. Chem Pharm Bull (Tokyo) 20:1175–1180

Yui T, Ogawa K, Kakuta M, Misaki A (1995) Chain conformation of a glucurono-xylo-mannan isolated from fruit body of *Tremella fuciformis* Berk. J Carbohydr Chem 14:255–263

Zhang J, Wang G, Li H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Suzuki C, Okamoto H, Li J (1994a) Antitumor polysaccharides from Chinese mushroom, “Yuhuahgmo”, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. Biosci Biotechnol Biochem 58:1195–1201

Zhang J, Wang G, Li H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Mayuzumi H, Okamoto H, Li J (1994b) Antitumor active protein-containing glycans from the Chinese mushroom Songshan Lingzhi, *Ganoderma tsugae* mycelium. Biosci Biotechnol Biochem 58:1202–1205

Zhang QH, Lin ZB (1999) The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst. (Ling Zhi) (Aphylllophoromycetidae) polysaccharides. Int J Med Mushrooms 1:207–215

Zhu D (1987) Recent advances on the active components in Chinese medicines. Abstr Chin Med 1:251–286

Zhuang C, Mizuno T, Shimada A, Ito H, Suzuki C, Mayuzumi Y, Okamoto H, Ma Y, Li J (1993) Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. Biosci Biotechnol Biochem 57:901–906

Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Kawade M (1994a) Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 41:724–732

Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Shimura K, Sumiya T (1994b) Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 41:733–740

274

Schaeffer DJ, Krylov VS (2000) Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and Cyanobacteria. Ecotoxicol Environ Saf 45:208–227

Sharon N, Lis H (1993) Carbohydrates in cell recognition. Sci Am Jan:74–81

Song CH, Jeon YJ, Yang BK, Ra KS, Kim HI (1998) Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. Biotechnol Lett 20:741–744

Sugimachi K, Maechara Y, Ogawa M, Kakegawa T, Tomira M (1997) Dose intensity of uracil and tegafur in postoperative chemotherapy for patients with poorly differentiated gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol 40:233–238

Stamets P (2000) Growing gourmet and medicinal mushrooms, 3rd edn. Ten Speed Press, Berkeley, Calif.

Tsuchida H, Mizuno M, Taniguchi Y, Ito H, Kawade M, Akasaka K (2001) Glucomannan separated from *Agaricus blazei* mushroom culture and antitumor agent containing as active ingredient. Japanese Patent 11–080206, 26 March 2001

Tzianabos AO (2000) Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. Clin Microbiol Rev 13:523–533

Ueno S, Yoshikumi C, Hirose F, Omura Y, Fujii T, Ohara M, Matsunaga K (1978) Preparation of anti-tumor polysaccharides. Japanese Patent 53109915, 26 September 1978

Ukai S, Morisaki S, Goto M, Kiho T, Hara C, Hirose K (1982)

Polysaccharides in fungi. VII. Acidic heteroglycans from the fruit bodies of *Auricularia auricula-judae* Quéf. Chem Pharm Bull 30:635–643

Ukai S, Kiho T, Hara C, Morita M, Goto A, Imaizumi N, Hasegawa Y (1983) Polysaccharides in fungi: XIII. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia* sp. Chem Pharma Bull (Tokyo) 31:741–744

Ukawa Y, Ito H, Hisamatsu M (2000) Antitumor effects of (1 → 3)-beta-D-glucan and (1 → 6)-beta-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.). J Biosci Bioeng 90:98–104

Wang G, Zhang J, Mizuno T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi H, Okamoto H, Li J (1993) Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan Lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. Biosci Biotechnol Biochem 57:894–900

Wang HX, Ng TB, Ooi VEC, Liu WK, Chanf ST (1996) A polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities. Biochem Cell Biol 74:95–100

Wasser SP, Weis AL (1997a) Shiitake mushrooms [*Lentinus edodes* (Berk.)Sing.]. In: Nevo E (ed) Medicinal mushrooms. Peledfus, Haifa, Israel

Wasser SP, Weis AL (1997b) Reishi mushroom [*Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.)P.Karst.]. In: Nevo E (ed) Medicinal mushrooms. Peledfus, Haifa, Israel

Wasser SP, Weis AL (1999) Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. Int J Med Mushrooms 1:31–62

Wasser SP, Nevo E, Sokolov D, Reshetnikov SV, Timor-Tismenetsky M (2000) Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. Int J Med Mushrooms 2:1–19