

Pozyskiwanie, budowa i działanie biologiczne polisacharydów grzybowych na przykładzie soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceum*)

Eliza Malinowska, Wojciech Krzyczkowski, Franciszek Herold
Katedra i Zakład Technologii Środków Leczniczych,
Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna, Warszawa

Isolation, composition and biological activities of mushroom polysaccharides on the example of *Hericium erinaceum*

Summary

In recent years mushroom polysaccharides have been extensively investigated according to their unique biological activity. Among them polysaccharides from *Hericium erinaceum* (Hydnaceae) are well known as anti-tumor and cholesterol reducing agents as well as growth and differentiation of adrenal nerve cells stimulators. In Poland, *H. erinaceum* is restricted only to several areas and is considered endangered species. Thus mycelium and culture broth obtained from submerged *in vitro* culture could be an excellent source of polysaccharides.

The review describes methods of isolation, purification and analysis of mushroom polysaccharides and summarizes data about biological activities of *Hericium erinaceum* polysaccharides.

Key words:

polysaccharide, analysis of carbohydrates, *yamabushitake*, cancer, Nerve Growth Factor.

1. Wstęp

Soplówka jeżowata *Hericium erinaceum* (Bull.: Fr.) Pers. (syn. *H. erinaceus*, *Clavaria erinaceus*, *Dryodon erinaceus*, *Hydnum erinaceus*, *Hydnum caput-medusae*) jest przedstawicielem klasy podstawczaków (Basidiomycetes), w większości krajów objętym ochroną

Adres do korespondencji

Eliza Malinowska,
Katedra i Zakład
Technologii Środków
Leczniczych,
Wydział Farmaceutyczny,
Akademia Medyczna,
ul. Banacha 1,
02-097 Warszawa;
e-mail:
eliza.malinowska@am.edu.pl



Rys. 1 Owocnik soplówki jeżowatej, fot. Marcin S. Wilga.

prawną i umieszczonym na tamtejszych „Czerwonych listach”. Grzyb ten ma w Polsce status gatunku wymierającego i poddano go ochronie ścisłej (1-3).

Hodowla soplówki prowadzona w warunkach laboratoryjnych stwarza możliwość pozyskiwania licznych substancji bioaktywnych, w tym polisacharydów o wielokierunkowym działaniu, a także cytotoksycznych hericenonów, neurotropowych erinacyń, przeciwbakteryjnych pochodnych orcynolu, oraz innych związków biologicznie czynnych (4-25). Dobór warunków bioprodukcji poprzez zmianę jego podstawowych parametrów (temperatura, odczyn pH, czas hodowli) lub składu pożywki pozwala uzyskać biomasę o pożądanym składzie.

2. Metody otrzymywania polisacharydów

Polisacharydy są strukturalnymi składnikami ściany komórkowej grzybów. Wyróżnia się dwa główne typy polisacharydów ściany komórkowej: sztywne włókniste polimery chitynowe lub celulozowe, oraz wypełniające wolne przestrzenie β - i α -glukany i glikoproteiny. Polisacharydy luźno związane z zewnętrzną warstwą ściany komórkowej stawiają opór ciśnieniu zewnętrznemu i jako rozpuszczalne w wodzie mogą być wydzielane poza komórkę (26).

Stopień rozpuszczalności polisacharydów w wodzie i roztworach alkaliów determinuje wybór metody ich ekstrakcji. Mizuno opracował podstawową procedurę izolacji i frakcjonowania polisacharydów z owocników lub grzybni uzyskanej w hodowli głębinowej (27). Metoda ta opiera się na eliminacji substancji niskocząsteczkowych z surowca za pomocą 85% etanolu, a następnie trzech ekstrakcji wrzącą wodą, 2% roztworem szczawianu amonu w 100°C i 5% roztworem NaOH w 80°C. Ekstrakcja wodna pozwala uzyskać polisacharydy rozpuszczalne w wodzie, a dalsze ekstrakcje – polisacharydy nierozpuszczalne w wodzie. Szczegóły metody ekstrakcji mogą różnić się w zależności od struktury wielocukrów i ich rozpuszczalności, jednak podstawową zasadą jest rozerwanie ściany komórkowej tak, aby wydobyć polisacharydy z głębszych jej warstw poprzez zaostrenie warunków ekstrakcji (pH i temperatura) (26).

Wyekstrahowane polisacharydy mogą być następnie oczyszczane za pomocą różnych technik, takich jak wytrącanie etanolem, kwasem octowym lub innym czynnikiem frakcjonującym, chromatografia jonowymienna (IEC, ang. *Ion Exchange Chromatography*), filtracja żelowa (GFC, ang. *Gel Filtration Chromatography*) i chromatografia powinowactwa (AC, ang. *Affinity Chromatography*).

Strącanie polisacharydów etanolem umożliwia usunięcie zanieczyszczeń pozostających w roztworze. Rozdział polisacharydów kwaśnych i neutralnych może być osiągnięty dzięki chromatografii kolumnowej na złożach jonowymiennych, takich jak DEAE-Cellulose lub DEAE-Sephadex. Polisacharydy neutralne są eluowane jako pierwsze, kwaśne natomiast opuszczają złożę podczas zwiększenia ilości NaCl w eluencie. Neutralne polisacharydy mogą być następnie różnicowane na α - i β -glukany za pomocą chromatografii powinowactwa opartej na procesie selektywnej adsorpcji, a następnie stopniowego odzyskiwania zaadsorbowanego składnika z unieruchomionego ligandu. Ostatnim etapem frakcjonowania polisacharydów, jest ich rozdział na podstawie mas cząsteczkowych za pomocą filtracji żelowej (26,27).

Mizuno opracowując trójstopniową metodę ekstrakcji poprzedzającą frakcjonowanie z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (DEAE-Cellulose, Toyopearl HW-65F oraz Con A-AF-Toyopearl 650) doprowadził do uzyskania pięciu frakcji polisacharydowych *H. erinaceum* działających przeciwnowotworowo (tab. 2) (27,28).

Li i wsp. przeprowadzili badania składu i struktury polisacharydów z grzybni *Heridium erinaceum* uzyskanej z hodowli *in vitro*. Do oczyszczenia polisacharydów używano chromatografii na złożach DEAE-Cellulose i DEAE-Sephadex. Homogenność frakcji sprawdzono przy użyciu chromatografii kolumnowej (Sephadex) i elektroforezy na żelu agarozowym. Masę cząsteczkową oszacowano za pomocą filtracji żelowej (29).

Z kolei przy użyciu chromatografii na złożu Sepharose CL-6B uzyskano dwie frakcje polisacharydowe nazwane HPA i HPB (30).

W badaniach innych autorów surową frakcję polisacharydową CPW uzyskaną z owocników sopłówki poddano deproteinacji i oczyszczaniu chromatograficznemu na kolumnie DEAE-Cellulose. Eluat wodny był następnie rozdzielany na kolumnie

napełnionej żelom Sephadex G-200, prowadząc do uzyskania głównej frakcji HEP-1 (31).

Izolacji rozpuszczalnych w NaOH frakcji polisacharydowych z *H. erinaceum* podjęli się Dong i wsp. Do oczyszczenia surowego polisacharydu CPB1 zastosowano chromatografię jonowymienną (DEAE-Celullose). Uzyskano homogenną frakcję HEP3 o masie powyżej 1 mln Da oszacowanej przy użyciu HPGPC (wysoko sprawna chromatografia żelowo-permeacyjna) z kolumną napełnioną złożem Ultrahydrogel (32).

Polisacharydy uwalniane do podłoża podczas hodowli głębinowej grzybni sołpówki były obiektem badań Parka i wsp. oraz Yanga i wsp. W niezależnych pracach obu autorów opisane są dwa rozpuszczalne w wodzie polisacharydy, odpowiednio EPS (egzopolisacharyd) wytrącony acetonem i oczyszczany za pomocą IEC (DEAE-Cellulose), a następnie na złożu Sephadex CL-5B, oraz EBP (egzobiopolimer) wytrącony etanolem (33,34).

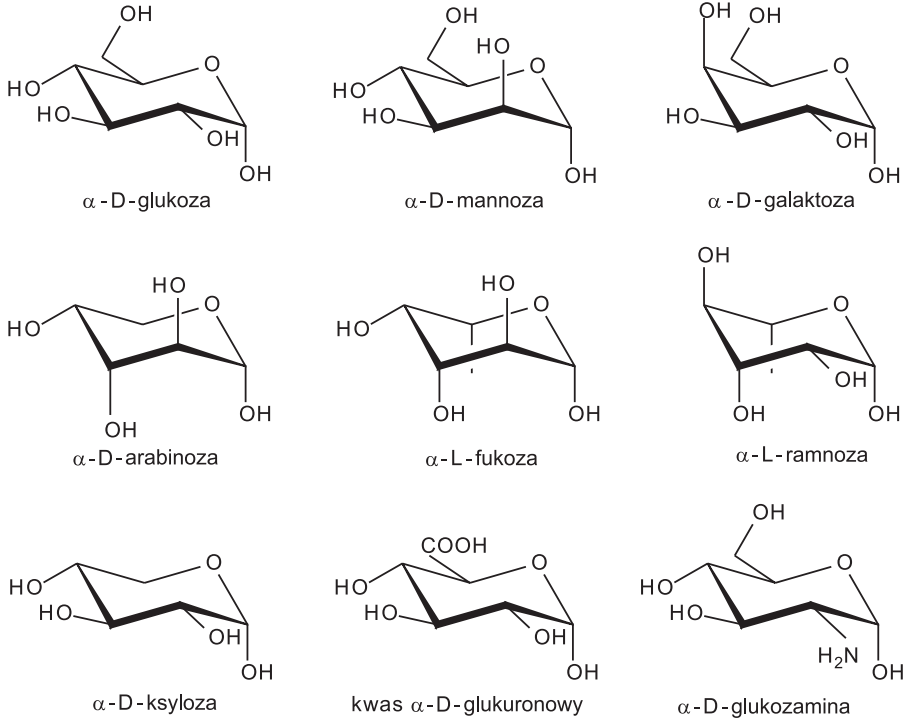
3. Właściwości strukturalne i fizyczne polisacharydów grzybowych oraz metody ich badania. Budowa polisacharydów *Hericium erinaceum*

Polisacharydy należą do zróżnicowanej klasy makromolekuł, których reszty monosacharydowe są połączone za pomocą wiązań glikozydowych. W przeciwieństwie do nukleotydów w kwasach nukleinowych i aminokwasów w białkach, które mogą być połączone między sobą wyłącznie liniowo, monosacharydowe jednostki w polisacharydach mogą łączyć się pomiędzy sobą w kilku miejscach, tworząc zarówno proste łańcuchy, jak i rozgałęzione struktury (26,35).

Do monomerów tworzących cząsteczkę polisacharydu należy zaliczyć glukozę, galaktozę, mannozę, ksylozę, arabinozę, fukozę lub kwas glukuronowy. U niektórych gatunków grzybów wielocukry są połączone z białkami lub peptydami (36).

Glukany są cząsteczkami o budowie liniowej lub rozgałęzionej utworzonymi przez reszty glukozy połączone wiązaniami α - lub β -glikozydowymi. Niektóre z nich posiadają przyłączone w różnych pozycjach łańcuchy boczne, zawierające molekuly monosacharydów połączone w różnych kombinacjach. Inną, dużą grupę polisacharydów biologicznie czynnych stanowią heteroglikany, które dzieli się na galaktany, fukany, ksyłany i mannany na podstawie składników cukrowych tworzących ich szkielet. Łańcuchy boczne heteroglikanów mogą zawierać arabinozę, mannozę, fukozę, galaktozę, ksylozę, kwas glukuronowy i glukozę jako główne składniki połączone ze sobą w różny sposób. Występowanie w cząsteczkach polisacharydów wielu możliwych konfiguracji wiązania glikozydowego utrudnia ustalenie uniwersalnego sposobu ich analizy i klasyfikacji.

Pierwszorzędową strukturę polisacharydów można opisać przez skład monosacharydowy, konfigurację i pozycję wiązań glikozydowych, sekwencję monosachary-



Rys. 2. Budowa głównych monomerów polisacharydów grzybowych (38).

dów, jak również poprzez charakter, liczbę i położenie dodatkowych grup niewęglowodanowych.

Analiza monosacharydów umożliwia określenie stosunku molowego poszczególnych cukrów, może też sugerować obecność specyficznych klas oligosacharydów, takich jak N- i O-glikany. Skład polisacharydu określa się po uprzedniej hydrolizie wszystkich wiązań glikozydowych, a następnie rozdzieleniu powstałych produktów i ich oznaczeniu jakościowym i ilościowym po derywatywacji monosacharydu z odpowiednim odczynnikiem. Tradycyjnie stosowaną do analizy monosacharydów chromatografię cienkowarstwową, zastępują ostatnio HPLC lub HPEC pozwalające na oznaczenie nawet femtomolowych (10^{-15}) ilości cukrów. Położenie wiązań glikozydowych może być określane poprzez analizę produktów trawienia enzymatycznego, analizę produktów metylowania i spektroskopię NMR. Metoda trawienia zewnętrznych połączeń glikozydowych (ang. *exoglycosidic digestion method*) jest ograniczona do kilku enzymów o wysokiej specyficzności. W analizie produktów metylowania polisacharydy są najpierw przekształcane w częściowo metylowane octany alditoli (alkoholi cukrowych), a następnie analizowane za pomocą chromatografii gazowej (GC-MS) i identyfikowane na podstawie czasów retencji i widma masowego. Na podstawie tej analizy można ustalić końcowe reszty monosacharydowe oraz spo-

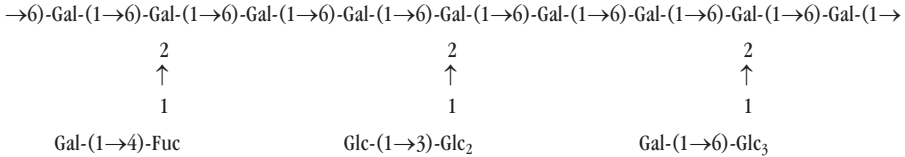
sób łączenia się ze sobą poszczególnych monomerów i miejsca rozgałęzień łańcucha. Badanie produktów metylowania nie daje jednak informacji o sekwencji składników oraz o rodzaju konfiguracji przy chiralnym atomie węgla. Anomeria wiązań (α lub β) może być wyznaczona za pomocą spektroskopii $^1\text{H-NMR}$. Techniki dwuwymiarowego NMR, w szczególności HMBC, COSY, TOCSY lub HSQC dostarczają bardziej szczegółowych informacji na temat budowy polisacharydów. Analiza kompleksów glikozydowych jest do tej pory bardzo słabo udokumentowana (26,39-41).

Tabela 1

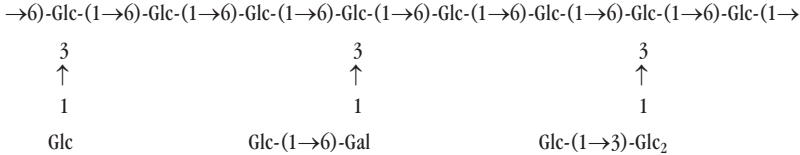
Budowa polisacharydów *Hericium erinaceum*

Nazwa frakcji polisacharydowej	Masa cząst. (kDa)	Skład cukrowy (stosunek mowy cukrów)	Całkowita zawartość cukru (%)	Całkowita zawartość białka (%)	Typ i rodzaj wiązań glikozydowych	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
FI ₀ -a	118	Glc:Xyl:Man:Gal (100:333:34:4)	53,4	34,2	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
FI ₀ -a- α	89	Xyl:Man (100:4)	40,5	51,5	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
FI ₀ -a- β	175	Glc:Xyl:Man:Gal (100:104:10:15)	89,7	4,2	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
FI ₀ -b	565	Glc:Xyl:Man:Gal (100:104:10:15)	71,4	22,1	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
FII-1	155	Glc:Xyl:Gal (100:179:17)	91,4	5,7	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
FIII-2-b	30	Glc:Xyl:Gal (100:51:32)	75,7	20,2	β -(1,3), β -(1,6)	(28)
HEPA1	62	heteropolisacharyd zawierający głównie glukozę	b.d.	b.d.	α	(29)
HEPA4	26	kompleks heteropolisacharydowo-peptydowy	b.d.	b.d.	α	(29)
HEPB2	12	heteropolisacharyd zawierający głównie glukozę	b.d.	b.d.	α	(29)
b.d.	>100	głównie glukoza	b.d.	b.d.	b.d.	(41)
HPA	50	Glc:Gal:Fuc (1:2,11:0,423)	100	–	por. rys. 3.	(30)
HPB	30	Gal:Glc (1:11,529)	85	13,5	por. rys. 4.	(30)
HEP-1	18	Rha:Glc:Gal (1,19:3,81:1,00)	b.d.	b.d.	łańcuch główny zbud. z (1→6)- α -D-Gal, łańc. boczne przył. do O-2 zbud. z Rha i Glc	(31)

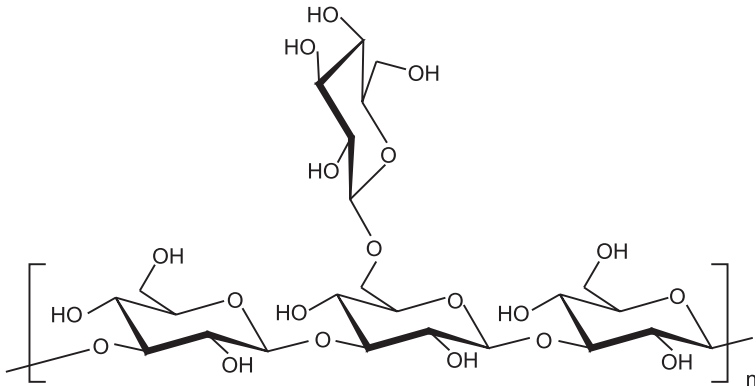
1	2	3	4	5	6	7
HEP3	>1000	Glc	b.d.	b.d.	β -(1→3) z bocznymi łańc. 0-6 w przybliżeniu co 3 jednostki w łańcuchu por. rys. 5.	(32)
HEPF3	19	Fuc:Gal (1:4,12)	b.d.	b.d.	łańcuch główny zbud. z (1→6)- α -D-Gal, łańc. boczne przył. do 0-2 zbud. z α -L-Fuc por. rys. 6.	(37)
EPS	1000	Glc:Gal:Xyl:Man:Fru (1,5:1,7:1,2:0,6:0,9)	b.d.	b.d.	b.d.	(33)
EBP	40	Man:Gal:Fuc:Glc:Ara:Xyl:Rib (35,4:34,1:20,1:8,4:1,5:0,3:0,2)	91,2	8,8	b.d.	(34)



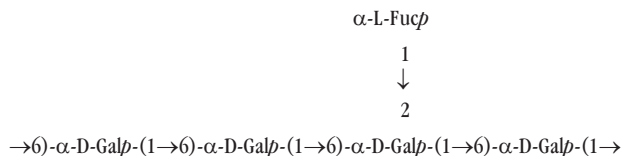
Rys. 3. Budowa frakcji polisacharydowej HPA (30).



Rys. 4. Budowa frakcji polisacharydowej HPB (30).



Rys. 5. Budowa frakcji polisacharydowej HEP3 (32).



Rys. 6. Budowa frakcji polisacharydowej HEPF3 (37).

4. Zależność pomiędzy strukturą polisacharydów a ich aktywnością przeciwnowotworową

Różnice w aktywności przeciwnowotworowej polisacharydów grzybowych wynikają z wielkości cząsteczki i stopnia jej rozgałęzienia oraz rozpuszczalności w wodzie.

Ważnymi czynnikami wpływającymi na aktywność przeciwnowotworową są obecność w glukanie zarówno wiązań $\beta\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}$ glikozydowych, jak i punktów rozgałęzienia $\beta\text{-}(1\rightarrow 6)$. $\beta\text{-}$ glukany zawierające głównie wiązania $1\rightarrow 6$ wykazują słabszą aktywność, prawdopodobnie z powodu giętkości ich cząsteczek i możliwości przyjmowania zbyt wielu różnych konformacji. Istnieją jednak dowody, że polisacharydy grzybowe z praktycznie wszystkimi możliwymi typami wiązań glikozydowych wykazują działanie przeciwnowotworowe (41).

Rodzaj monomerów tworzących łańcuch polisacharydu także wpływa na aktywność przeciwnowotworową makrocząsteczki. Lombard stwierdził, że obecność w ludzkich makrofagach receptorów specyficznych dla glukozy i mannozy jest prawdopodobną przyczyną silniejszego działania przeciwnowotworowego polisacharydów zbudowanych głównie z tych cukrów (43).

Podczas gdy niektóre homopolisacharydy np. $\beta\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}$ glukany o dużych cząsteczkach (od 500 do 2000 kDa) działają silniej od tych o małej masie, właściwości przeciwnowotworowe pewnych heteropolisacharydów, takich jak np. $\alpha\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}$ glukuronoksylomannany nie są tak silnie zależne od masy cząsteczkowej (44).

Polisacharydy mogą przyjmować konformację potrójnej lub pojedynczej helisy, jak również przypadkowego zwoju. Uważa się, że konformacja potrójnej helisy $\beta\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}$ glukanów jest istotna dla ich aktywności immunostymulującej (26,45).

5. Mechanizm działania przeciwnowotworowego polisacharydów.

Działanie przeciwnowotworowe polisacharydów soplówki jeżowatej

Polisacharydy grzybowe działają przeciwnowotworowo głównie poprzez aktywację odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Substancje te uważane są za biologiczne modyfikatory odpowiedzi (BMO, ang. *biological response modifiers*, BRMs) (41,46).

W przeciwieństwie do tradycyjnych leków przeciwnowotworowych polisacharydy nie wywołują istotnych działań niepożądanych (46). Właściwość ta umożliwia zastosowanie polisacharydów nie tylko w terapii monolekowej, ale również jako środki wspomagające chemioterapię.

Tabela 2

Aktywność przeciwnowotworowa polisacharydów *Hericium erinaceum* w badaniach na myszach obciążonych guzem litym Sarcoma 180

Polisacharyd	Inhibicja (%)	Czas przeżycia (T/K)	Całkowita regresja	Śmiertelność
Kontrola (K)	0	1,00	0/10	10/10
FI ₀ -a	40,3	1,54	1/7	3/7
FI ₀ -a-α	65,9	1,78	3/7	2/7
FI ₀ -a-β	73,0	1,86	4/7	1/7
FI ₀ -b	63,8	1,71	2/7	3/7
FII-1	67,9	1,81	1/7	1/7
FIII-2-b	75,9	1,75	3/7	0/7

Objaśnienie:

Dawki polisacharydów 10 mg/kg dootrzewnowo przez 10 kolejnych dni; wielkość guza mierzono po 28 dniach, a czas przeżycia i śmiertelność po 61 dniach od podskórnej implantacji guza (28).

Wielokierunkowy mechanizm działania polisacharydów grzybowych obejmuje bezpośrednie indukowanie apoptozy komórek guza, a także zapobieganie onkogenezie i przerzutowaniu, związane z ich aktywnością immunostymulującą (26,47). Związki te nie zabijają bezpośrednio komórek rakowych, lecz wywierają niespecyficzne działanie na organizm, pomagając mu przetrwać chorobę. Przeciwnowotworowe działanie wielocukrów wymaga obecności komórek T i jest oparte na grasicozależnym mechanizmie odporności (48).

Antyproliferacyjną aktywność polisacharydów (bezpośrednia aktywność hamująca rozwój guza) należy tłumaczyć tym, że polisacharydy zmieniają ekspresję sygnałów w komórkach nowotworowych, co może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i indukację apoptozy. Polisacharydy mogą także bezpośrednio indukować apoptozę komórek nowotworowych przez zwiększanie ekspresji proapoptycznego białka Bax, zmniejszenie ekspresji cyklin D1, E i B1 oraz zwiększenie ekspresji genu p21 działającego jako regulator przejścia komórki w fazę G1 (49).

Na podstawie badań z użyciem linii komórkowej szczurzych makrofagów RAW 264.7 poznano mechanizm aktywacji odpowiedzi immunologicznej przez β-glukan obecny w wodnym wyciągu z *H. erinaceum* (WEHE). Wykazano, że zachodzi on poprzez indukację jednej z izoform syntazy tlenku azotu (iNOS), co prowadzi do zwiększenia produkcji NO odgrywającego główną rolę w procesach odpornościowych i przeciwnowotworowych.

Wyciąg wodny z soplówki jeżowatej powoduje również zwiększenie ilości jądrowego czynnika κB (NF- κB), który jest regulatorem transkrypcyjnym nie tylko genu iNOS, ale również wielu innych genów kodujących cytokiny (IL-1 β , TNF- α oraz IL-6), czynniki regulujące cykl komórkowy (cykliny D i E) oraz czynniki proapoptyczne, takie jak p53 supresor guzów (50,51).

6. Działanie stymulujące wzrost komórek nerwowych

Niska skuteczność w walce z chorobami degeneracyjnymi układu nerwowego, takimi jak choroba Parkinsona czy Alzheimerera stworzyła konieczność poszukiwania substancji neuroprotektynnych. W badaniach *in vitro* wykorzystuje się różne rodzaje komórek nerwowych, włączając w to pierwotne komórki zarodkowe, wymagające stymulacji za pomocą różnych czynników wzrostowych. Czynniki wzrostu nerwów są białkami wydzielanymi przez komórkę, które pobudzają tę lub inne komórki do podziału lub różnicowania się. Najczęściej stosuje się czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. *Nerve Growth Factor*) i czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *Brain-Derived Nerve Factor*).

W eksperymencie przeprowadzonym na linii komórek PC12 wywodzącej się z guza chromochłonnego nadnerczy szczurów wykazano, że uzyskany z hodowli głębinowej *H. erinaceum* egzopolisacharyd (EPS, ang. *exo-polysaccharide*) przyspiesza wzrost komórek, a także zwiększa rozwój neurytów. Jego efektywność jest wyższa niż NGF oraz BDNF. W hodowli kontrolnej po osiągnięciu maksymalnej gęstości komórek następuje zahamowanie wydłużania się neurytów, natomiast dodatek EPS do hodowli powoduje dalszą elongację neurytów i powstawanie zakończeń nerwowych nawet, wtedy gdy wzrost samych komórek zostaje zatrzymany. Stwierdzono, że EPS w pierwszej kolejności wydłuża neuryty już istniejące w komórkach, następnie zwiększa liczbę komórek i tworzenie nowych aksonów. Egzopolisacharyd efektywniej opóźnia apoptozę komórek PC12 niż badane czynniki wzrostu nerwów, utrzymując ilość apoptujących komórek na poziomie 20% w stosunku do 51% apoptujących komórek w hodowli porównawczej (33).

7. Działanie hipolipidemiczne

Ważnym kierunkiem działania polisacharydów soplówki jeżowatej jest zdolność do obniżania poziomu cholesterolu i lipidów we krwi.

Egzobiopolimer (EBP) uzyskany z hodowli głębinowej *Heridium erinaceum* użyto w badaniach efektu hipolipidemicznego (cholesterol całkowity i LDL) i aktywności reduktazy HMG-CoA na szczurach. EBP znacząco obniżył poziom całkowitego cholesterolu i frakcji lipoprotein LDL proporcjonalnie do zastosowanej dawki. Zasugerowano, że efekt ten może być związany z rosnącą lepkością frakcji polisacharydowej.

Prawdopodobnie dzięki tej właściwości EBP może obniżać wchłanianie trójglicerydów i cholesterolu poprzez hamowanie tworzenia miceli w jelicie cienkim oraz poprzez zmianę właściwości fizycznych śluzówki jelita. Redukcja poziomu cholesterolu całkowitego (TC) oraz frakcji LDL może być także wynikiem zmniejszonej syntezy cholesterolu przez wątrobę poprzez hamowanie reduktazy HMG-CoA i/lub sprawniejszego usuwania lipoprotein. EBP podwyższa zawartość HDL („dobry cholesterol”) w surowicy krwi i jednocześnie obniża indeks aterogenny (stosunek LDL/HDL), poziom triglicerydów i fosfolipidów poprzez zwiększenie aktywności LPL (lipazy lipoproteinowej).

W badaniach na zwierzętach nie wykazano jakiegokolwiek toksyczności związanej z podawaniem EBP (34).

8. Podsumowanie

Wzrastająca liczba zachorowań na nowotwory złośliwe stwarza konieczność poszukiwania naturalnych substancji przeciwnowotworowych i immunostymulujących, bezpieczniejszych i tańszych od leków powszechnie stosowanych w chemioterapii. Od ponad 30 lat trwają intensywne badania nad polisacharydami grzybowymi, spośród których kilka zostało już zarejestrowanych jako leki (lentinan, schizophyllan, grifon-D, krestin) (26,39,40).

W artykule tym przybliżamy metody izolacji i analizy polisacharydów pozyskiwanych z grzybów wyższych oraz podsumowujemy aktualny stan wiedzy na temat budowy i działania wielocukrów soplówki jeżowatej. Ograniczony zasięg występowania soplówki na terenie Polski i wpisanie tego grzyba na listę gatunków wymierających niesie ze sobą potrzebę prowadzenia hodowli w warunkach laboratoryjnych. Odpowiednio przeprowadzony proces biosyntezy pozwala otrzymać z dobrą wydajnością produkt o pożądanym właściwościach.

Stosowane skróty:

Ara – arabinoza, b.d. – brak danych, BDNF – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, BRMs – biologiczne modyfikatory odpowiedzi, COSY – homojądrowa spektroskopia korelacyjna, DEAE – dietyloaminoetyl, EBP – egzobiopolimer, EPS – egzopolisacharyd, Fru – fruktoza, Fuc – fukoza, Gal – galaktoza, GC-MS – chromatografia gazowa ze spektroskopią mas, GFC – filtracja żelowa, Glc – glukoza, HDL – lipoproteiny o dużej gęstości, HMBC – heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu, HMG-CoA – 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzym A, HMQC – wielokrotna heterojądrowa koherencja kwantowa, HPEC – wysoko sprawna elektroforeza, HPGPC – wysoko sprawna chromatografia żelowo-permeacyjna, HPLC – wysoko sprawna chromatografia cieczowa, IEC – chromatografia jonowymienna, IL – interleukina, iNOS – indukowana syntaza tlenu azotu, LDL – lipoproteiny o małej gęstości, LPL – lipaza lipoproteinowa, Man – mannoza, NGF – czynnik wzrostu nerwów, NMR – magnetyczny rezonans jądrowy, Rha – ramnoza, Rib – ryboza, TC – cholesterol całkowity, TNF – czynnik martwicy nowotworu, TOCSY – spektroskopia korelacji całkowitej, Xyl – ksylloza.

Literatura

1. Wojewoda W., Ławrynowicz M., (2006), *Red list of the macrofungi in Poland*, W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
2. Grzywacz A., Nieto J. C., (1989), *Grzyby chronione*, PWRiL, Warszawa.
3. Rozporządzenie Ministra Środowiska, (2004), Dz. U., 04.168,1765.
4. Kawagishi H., Ando M., Mizuno T., (1990), *Tetrahedron Lett.*, 31, 3, 373-376.
5. Kawagishi H., Ando M., Sakamoto H., Yoshida S., Ojima F., Ishiguro Y., (1991), *Tetrahedron Lett.*, 32, 35, 4561-4564.
6. Kawagishi H., Ando M., Shinba K., Sakamoto H., Yoshida S., Ojima F., (1993), *Phytochemistry*, 32, 1, 175-178.
7. Kawagishi H., Shimada A., Shirai R., Okamoto K., Ojima F., Sakamoto H., (1994), *Tetrahedron Lett.*, 35, 10, 1569-1572.
8. Kawagishi H., Shimada A., Shizuki K., Mori H., Okamoto K., Sakamoto H., (1996), *Heterocycl. Commun.*, 2, 1, 51-54.
9. Kawagishi H., Shimada A., Hosokawa S., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., (1996), *Tetrahedron Lett.*, 37, 41, 7399-7402.
10. Saito T., Aoki F., Hirai H., Inagaki T., Matsunaga Y., Sakakibara T., (1998), *J. Antibiot.*, 51, 11, 983-990.
11. Lee E. W., Shizuki K., Hosokawa S., Suzuki M., Sudanuma H., Inakuma T., (2000), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 11, 2402-2405.
12. Kawagishi H., Masui A., Tukuyama S., Nakamura T., (2006), *Tetrahedron*, 62, 8463-8466.
13. Kenmoku H., Sassa T., Kato N., (2000), *Tetrahedron Lett.*, 41, 4389-4393.
14. Kenmoku H., Kato N., Shimada N., Omoto M., Mori A., Mitsuhashi W., (2001), *Tetrahedron Lett.*, 42, 7439-7442.
15. Kenmoku H., Shimai T., Toyomasu T., Kato N., Sassa T., (2002), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 3, 571-575.
16. Kenmoku H., Tanaka K., Okada K., Kato N., Sassa T., (2004), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 8, 1786-1789.
17. Shimbo M., Kawagishi H., Yokogoshi H., (2005), *Nutr. Res.*, 25, 617-623.
18. Okamoto K., Shimada A., Shirai R., Sakamoto H., Yoshida S., Ojima F., (1993), *Phytochemistry*, 34, 5, 1445-1446.
19. Qian F. G., Xu G. Y., Du S. J., Li M. H., (1990), *Yao Xue Xue Bao (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 25, 7, 522-525.
20. Kawagishi H., Mori H., Uno A., Kimura A., Chiba S., (1994), *FEBS Lett.*, 340, 56-58.
21. Kawagishi H., Ando M., Mizuno T., Yokota H., Konishi S., (1990), *Agric. Biol. Chem.*, 54, 5, 1329-1331.
22. Arnone A., Cardillo R., Nasini G., Vajna de Pava O., (1994), *J. Nat. Prod.*, 57, 5, 602-606.
23. Yaoita Y., Danbara K., Kikuchi M., (2005), *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 9, 1202-1203.
24. Wang H. X., Ng T. B., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322, 17-21.
25. Kimura Y., Nishibe M., Nakajima H., Hamasaki T., Shimada A., Tsuneda A., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 10, 2673-2674.
26. Zhang M., Cui S. W., Cheung P. C. K., Wang Q., (2007), *Trends Food Sci. Tech.*, 18, 4-19.
27. Mizuno T., Ohsawa K., Hagiwara N., Kuboyama R., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1679-1688.
28. Mizuno T., Wasa T., Ito H., Suzuki C., Ukai N., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2, 347-348.
29. Li K., He Y., (1999), *Zhongguo zhong yao za zhi*, 24, 12, 742-744.
30. Wang Z., Luo D., Liang Z., (2004), *Carbohydr. Polym.*, 57, 241-247.
31. Jia L., Liu L., Dong Q., Fang J., (2004), *Carbohydr. Res.*, 339, 2667-2671.
32. Dong Q., Jia L., Fang J., (2006), *Carbohydr. Res.*, 341, 791-795.
33. Park Y. S., Lee H. S., Won M. H., Lee J. H., Lee S. Y., Lee H. Y., (2002), *Cytotechnology*, 39, 155-162.
34. Yang B.-K., Park J.-B., Song C.-H., (2003), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67, 6, 1292-1298.
35. Sharon N., Lis H., (1993), *Sci. Am.*, 1, 74-81.

36. Cui J., Chisti Y., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 21, 109-122.
37. Zhang A., Zhang J., Qing T., Wei J., Yang Y., Liu Y., Fan J., Pan Y., (2006), *Carbohydr. Res.*, 341, 645-649.
38. McMurry J., (2005), *Chemia organiczna*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, t. 4, rozdz. 26.
39. Daba A. S., Ezeronye O. U., (2003), *Afr. J. Biotech.*, 2, 12, 672-678.
40. Reshetnikov S. V., Wasser S. P., Tan K. K., (2001), *Int. J. Med. Mush.*, 3, 361-394.
41. Wasser S. P., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-273.
42. Wang J. C., Hu S. H., Su C. H., Lee T. M., (2001), *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 17, 9, 461-467.
43. Lombard Y. J., (1994), *J. Immunol. Methods*, 174, 155-163.
44. Mizuno T., (1996), *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 167, 69-87.
45. Maeda Y. Y., Watanabe S. T., Chihara C., Rokutanda M., (1988), *Cancer. Res.*, 48, 671-675.
46. Wasser S. P., Weis A. L., (1999), *Int. J. Med. Mush.*, 1, 31-51.
47. Ikekawa T., (2001), *Int. J. Med. Mush.*, 3, 291-298.
48. Ooi V. E. C., Liu F., (1999), *Int. J. Med. Mush.*, 1, 195-206.
49. Zaidman B. Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S. P., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 1-24.
50. Son C. G., Shin J. W., Cho J. H., Cho C. K., Yun C.-H., Chung W., (2006), *Int. Immunopharmacol.*, 6, 1363-1369.
51. Son C. G., Shin J. W., Cho J. H., Cho C. K., Yun C.-H., Han S. H., (2006), *Acta Pharmacol. Sin.*, 27, 8, 1058-1064.